

Aus der Klinik und Poliklinik für
Innere Medizin III
(Direktor: Professor Dr. med. Wolfgang Herr)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

Die Lokalisation von PD-1 während des „Kiss of Death“

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Lukas Kremmler
aus Würzburg

2013

Aus der Klinik und Poliklinik für
Innere Medizin III
(Direktor: Professor Dr. med. Wolfgang Herr)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

Die Lokalisation von PD-1 während des „Kiss of Death“

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Lukas Kremmler
aus Würzburg

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Christian Blank
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Daniela Männel

Tag der mündlichen Prüfung: 13. März 2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Immunsystem	1
1.1.1. Adaptive Immunität	1
1.1.2. Lymphozyten	2
1.2. T-Zell-Aktivierung	3
1.2.1. Antigen-Erkennung	3
1.2.2. TCR Signalvermittlung	4
1.2.3. Immunsynapse	4
1.2.4. Zytoskelett	4
1.2.5. CD8 ⁺ Effektorfunktion	5
1.2.6. Kostimulation	6
1.2.7. Koinhibition	6
1.3. Tumorgenese und Immunsystem	8
1.3.1. Tumor-Antigene	9
1.3.2. Immunantwort	10
1.3.3. Tumor Immunescape	11
1.3.3.1. Hemmung der Tumorerkennung	11
1.3.3.2. Einfluss von Chemokinen und Liganden	12
1.3.3.3. Fehlen von Kostimuli	13
1.3.3.4. Zelluläre Inhibitoren	13
1.4. Tumor-infiltrierende Lymphozyten	14
1.4.1. Anergie	14
1.4.2. Exhaustion	15
1.4.3. Defekte in T-Zell-Signal und MTOC-Polarisierung	15
1.5. Programmed Death Receptor 1 (PD-1)	16
1.5.1. Struktur, Vorkommen und Signalwirkung	16
1.5.2. PD-1-Liganden und zweiter Rezeptor	17
1.5.3. PD-1 und Autoimmunität	18

1.5.4.	PD-1 in Infektion und Exhaustion	19
1.5.5.	PD-1 und Tumore	20
1.5.6.	Lokalisation von PD-1	21
1.6.	Fragestellung dieser Promotion	22
2.	Material und Methoden	24
2.1.	Material	24
2.1.1.	Tumorzelllinien	24
2.1.2.	Mausstämme	24
2.1.3.	Antikörper	26
2.2.	Methoden	28
2.2.1.	Zellkultur / Technik	28
2.2.1.1.	Zentrifugation	28
2.2.1.2.	Zellzählung mit Trypanblau	28
2.2.2.	Zellkultur	28
2.2.2.1.	Splitten von Tumorzelllinien	28
2.2.2.2.	Mycoplasmentest	29
2.2.2.3.	Auftauen und Einfrieren von Zelllinien	29
2.2.3.	Isolierung muriner Zellen	29
2.2.3.1.	Splenektomie aus Mäusen	29
2.2.3.2.	Gewinnung naiver T-Zellen aus Milzen	29
2.2.3.3.	Dynal-Kit	30
2.2.3.4.	SpinSep-Kit	31
2.2.4.	<i>In vitro</i> Stimulation mit P815.B7-1	32
2.2.5.	Analyse von Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie	32
2.2.5.1.	Prinzip des FACS	32
2.2.5.2.	Antikörperfärbung auf murinen Zellen	34
2.2.5.3.	Labeling von 1B2	34
2.2.5.4.	Analyse der T-Zell-Aufreinigung	35
2.2.6.	Beads	35
2.2.6.1.	Coating von Beads mit Antikörpern	36
2.2.6.2.	Stimulation von T-Zellen mit Beads für ELISA	36
2.2.7.	<i>in vitro</i> Assays	36
2.2.7.1.	Target Tumoren	36
2.2.7.2.	Zytokinproduktion – ELISA	37

2.2.7.3.	Proliferation – Tritium-Thymidine-Assay	38
2.2.7.4.	Zytotoxizität – LAMP-Test	38
2.2.7.5.	Zytotoxizität – Chrome-Release-Assay	38
2.2.8.	Immunfluoreszenz	39
2.2.8.1.	Labeling von Antikörpern mit Alexa Fluor	39
2.2.8.2.	Objektträger	40
2.2.8.3.	Immunfluoreszenz-Färbung	40
2.2.8.4.	Mikroskopie	41
2.2.8.5.	Analyse von Zellkonjugaten und Zellpolarisierungen . . .	41
2.2.9.	Statistik	42
3.	Ergebnisse	43
3.1.	T-Zell-Stimulation mit Beads	43
3.2.	T-Zell-Tumor-Interaktion	47
3.2.1.	T-Zell-Stimulation mit p815.B7-1	47
3.2.2.	Funktionalitätsassays	51
3.2.2.1.	Verminderte Zytokinproduktion bei transgener Überex- pression von PD-1	52
3.2.2.2.	Höchste Zellproliferationsrate bei PD-1-Abwesenheit . .	53
3.2.2.3.	Höchste Zytotoxizität bei PD-1-Abwesenheit	53
3.2.3.	PD-L1 auf T-Zellen ohne Effekt auf T-Zell-Funktionalität	54
3.2.4.	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	57
3.2.4.1.	PD-1-Expression auf aktivierten T-Zellen in Clustern . .	59
3.2.4.2.	Lokalisation von PD-1 während des Zellkontakts	60
3.2.4.3.	B16 Melanomzellen ohne PD-L1-Polarisierung	63
3.2.5.	Einfluss von PD-1 auf die Synapsenbildung	64
3.2.5.1.	PD-1 ohne Einfluss auf Konjugatbildung	64
3.2.5.2.	Effektivere Polarisierung von Granzym bei PD-1-Absenz	65
4.	Diskussion	67
4.1.	Sterische Inhibition des Beadcoatings durch PD-L1.Ig	67
4.2.	Exhaustion bei repetitiver Stimulation	69
4.3.	PD-1 vermittelte Inhibition der Effektorfunktionen	71
4.4.	PD-1 in Immunfluoreszenz-Mikroskopie	74
4.5.	Zellpolarisierung in Abhängigkeit der PD-1-Expression	79

5. Zusammenfassung	81
Literaturverzeichnis	83
A. Danksagung	104

Abbildungsverzeichnis

1.1. Formation des Kiss of Death	5
1.2. Kostimulatoren der B7-Familie	7
1.3. PD-1 und Liganden	18
1.4. PD-L1 Signalwirkung	20
1.5. PD-1 Lokalisation	22
2.1. Gewinnung und Aufbereitung von murinen T-Zellen	30
2.2. T-Zell FACS Analyse	33
2.3. CD8-Konzentration im FACS	35
3.1. Zytokin-Produktion nach Bead-Stimulation	43
3.2. Antikörper-Dichte auf Beads	45
3.3. Zytokin-Produktion bei Isotypen Titration	46
3.4. Phänotyp von p815.B7-1	47
3.5. Kinetik von PD-1 auf 2C TCRtg T-Zellen	48
3.6. Kinetik von Aktivierungsmarkern auf 2C TCRtg T-Zellen	49
3.7. Kinetik von CD80 und CD86 auf 2C TCRtg T-Zellen	50
3.8. Expansionsfaktoren nach Stimulationsrunden	51
3.9. Phänotyp von B16.SIY	52
3.10. 2C Zytokin-Produktion und Proliferation	53
3.11. 2C Zytotoxizität	54
3.12. Phänotyp von PD-L1-defizienten T-Zellen	55
3.13. Einfluss von lymphozytärem PD-L1 auf T-Zell-Proliferation	56
3.14. Einfluss von lymphozytärem PD-L1 auf T-Zell-Funktionalität	57
3.15. Immunfluoreszenz - PD-1 auf T-Zellen	58
3.16. Immunfluoreszenz - PD-L1 auf T-Zellen	59
3.17. Immunfluoreszenz - PD-1 und Tubulin	60
3.18. Immunfluoreszenz - PD-1 und Tubulin	61
3.19. Immunfluoreszenz - T-Zell-Rezeptor und Tubulin	61

3.20. Immunfluoreszenz - PD-1 und CD3	62
3.21. Immunfluoreszenz - PD-L1 und Tubulin	62
3.22. Immunfluoreszenz - PD-L1 auf Tumor	63
3.23. Immunfluoreszenz - MTOC-Translokation	64
3.24. Einfluss von PD-1 auf MTOC-Translokation	65
3.25. Immunfluoreszenz - Granzym-Polarisierung	66
3.26. Immunfluoreszenz - Granzym-Polarisierung	66
4.1. Fluorochrom Spektren	76

Tabellenverzeichnis

2.1. Tumorzelllinien	24
2.2. Mäusestämme	25
2.3. FACS Antikörper	26
2.4. Antikörper und Standards für ELISA	27
2.5. Antikörper für Immunfluoreszenz	27
2.6. Fluorochrome	39
5.1. Abkürzungsverzeichnis	103

1. Einleitung

1.1. Immunsystem

Das oberste Gebot eines jeden Organismus ist das Überleben in seiner Umwelt und die Wahrung seiner Integrität. Hinter den physischen Barrieren existiert in Mensch und Tier das Immunsystem, das sowohl gegen Gefahren von Außen, wie z.B. Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten, als auch gegen potentiell bedrohliche Veränderungen von innen, wie z.B. die mögliche Entwicklung von Tumoren, schützen soll. Das Immunsystem, bestehend aus zellulären und molekularen Effektoren, kann dabei unterschieden werden in einen angeborenen, nativen und in einen erworbenen, adaptiven Anteil.

Die angeborene Immunität ermöglicht ab Existenzbeginn eine rasche, jedoch relativ unspezifische Reaktion auf bis dato dem Organismus unbekannte Pathogene, bei der die Immuneffektoren verloren werden. Hierzu gehören unter anderem die Botenstoffe Zytokine, das Komplementsystem sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Granulozyten und Phagozyten.

Die adaptive, erworbene Immunität stellt die Antwort dar, die sich gezielt auf den Fremdkörper hin entwickelt und mit der Ausbildung von Gedächtniszellen eine rasche Antwort auf einen erneuten Befall ermöglicht. Diese Reaktion ist hoch-spezifisch und steigert sich bei wiederholter Exposition des Pathogens. [81]

1.1.1. Adaptive Immunität

Die adaptive Immunantwort erfolgt auf zwei Wegen: humoral und zellvermittelt. Antikörper in Blutserum und Sekreten stellen die humorale Immunität dar. Sie werden von B-Lymphozyten produziert und neutralisieren Pathogene direkt oder markieren sie für die anschließende zellvermittelte Zerstörung. Die zelluläre Immunität besteht z.B. aus T-Lymphozyten, die Fremdkörper oder infizierte körpereigene Zellen anhand ihres T-Zell-Rezeptors erkennen.

Antikörper und T-Zell-Rezeptoren sind spezifisch für bestimmte Epitope, also kleinste Protein- oder Polysaccharidkomplexe. Bei der Generierung der antigen-bindenden

Region entstehen Kombinationen, die pro Individuum bis zu 10^9 verschiedene Epitope hoch-spezifisch erkennen.

Aufgrund der breiten Palette an detektierbaren Epitopen bedarf es im Gesunden eines Kontrollmechanismus, der eine Reaktivität gegen eigenes Gewebe verhindert. Diese Toleranzbildung findet zentral während der Lymphozytenschulung und in der Peripherie statt. Außerdem existieren zellulär- und zytokin-vermittelte Mechanismen, die eine korrekt gestartete Immunantwort auf das Pathogen beschränken und nach dessen Vernichtung wieder beenden. Eine Störung der Kontrollen kann zu auto-reaktiven Erkrankungen führen. [1]

1.1.2. Lymphozyten

Lymphozyten werden unterteilt in B-Zellen und T-Zellen, die beide über spezifische Antigen-Rezeptoren verfügen. Zellen eines Klons besitzen dabei den gleichen Antigen-Rezeptor und unterscheiden sich damit von anderen Klonen mit unterschiedlichen Erkennungssequenzen. B-Lymphozyten produzieren und sezernieren nach positiver Antigen-Erkennung Antikörper.

T-Lymphozyten, denen hier das Augenmerk gilt, erkennen Peptide auf der Zelloberfläche sowie solche, die im Serum an Haptene gebunden sind, und teilen sich wiederum in die Klasse der T-Helfer-Zellen und der T-Killer-Zellen auf. Oberflächenmarker, sogenannte „Cluster of Differentiation“, helfen, die zwei T-Zell-Subpopulationen phänotypisch zu unterscheiden: während T-Helfer-Zellen CD4 exprimieren, findet sich auf den zytotoxischen T-Killer-Zellen vornehmlich CD8. $CD4^+$ Zellen reagieren mit MHC-II-Komplexen, $CD8^+$ Zellen hingegen mit MHC-I.

Bei T-Helfer-Zellen führt die Antigen-Erkennung zur Produktion und Sekretion von Zytokinen, die das Immunsystem zu Spezialisierung und Vermehrung immun-kompetenter Zellen anstößt. T-Killer-Zellen sind in der Lage, Zielzellen bzw. Pathogene direkt zu neutralisieren. Des Weiteren existiert die Subgruppe der NKT- oder Natürliche Killer-T-Zellen, die im Gegensatz zu „normalen T-Zellen“ nicht an den MHC-Peptid-Komplex, sondern an den Komplex aus CD1d und darauf präsentierten Lipiden binden und nach erfolgreicher Erkennung zytolytisch wirken können. Als weitere besonders interessante T-Zell-Untergruppe gelten die regulatorischen T-Zellen (Treg), deren größte Population sich durch den $CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ Phänotyp auszeichnet. Diese Tregs sind über Effektoren wie TGF- β oder IL-10 in der Lage, die Reaktion des Immunsystems zu regulieren.

Der die T-Zellen charakterisierende T-Zell-Rezeptor (TCR) ist ein Heterodimer aus einer

alpha (α)- und einer beta (β)-Kette, die über Sulfid-Brücken kovalent verbunden sind. Diese Ketten bestehen aus einem konstanten C- und einem variablen V-Teil; letzterer begründet die breite Variabilität und gleichzeitig hohe Spezifität unterschiedlicher T-Zell-Klone. Daneben existiert eine Population, die statt α - und β -Ketten sogenannte gamma (γ)- und delta (δ)-Ketten als Heterodimer im TCR einbauen; diese γ - δ -TCR T-Zellen kommen gehäuft in epithelialen Geweben vor, und sind nicht auf die Erkennung via MHC-Präsentation limitiert. [28]

Die im Knochenmark gebildeten T-Zellen migrieren zum Zweck der Reifung in den Thymus. Dort findet die Auslese optimaler Lymphozyten statt. Bei der positiven Selektion überleben nur die Lymphozyten, die schwache Bindungen mit Eigenpeptiden eingehen, während eine fehlende Peptid-Erkennung zur Apoptose führt: „Death by Neglect“. Die negative Selektion sortiert anschließend Lymphozyten aus, die eine zu hohe Reaktivität gegenüber eigenen Antigenen und damit ein auto-immunes Potential bieten. [152]

Die antigen-spezifische Aktivierung einer T-Zelle führt zur klonalen Expansion und der Bildung von Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Auftreten des Pathogens eine schnelle, spezifische Immunantwort ermöglichen.

1.2. T-Zell-Aktivierung

1.2.1. Antigen-Erkennung

Kernhaltige Zellen präsentieren Bruchstücke ihrer Genprodukte auf ihrer Oberfläche. Dazu werden zytosolische Proteine in Proteasomen in Peptide aufgespalten und im endoplasmatischen Retikulum (ER) an Major Histocompatibility Complex Class I (MHC-I)-Proteine gekoppelt. Diese Komplexe werden via Golgi-Apparat und exozytotische Vesikel an die Zelloberfläche transportiert und von $CD8^+$ T-Zellen ausgelesen.

Alternativ existieren professionelle antigen-präsentierende Zellen, z.B. dendritische Zellen (DC), Makrophagen und B-Zellen, die extrazelluläre Proteine durch rezeptorvermittelte Endozytose aufnehmen, prozessieren und schließlich an MHC-II-Moleküle gebunden auf der Zelloberfläche präsentieren. $CD4^+$ T-Zellen erkennen diese MHC-II-Komplexe und verursachen bei Erkennung eines Fremdanagens eine Aktivierung des Immunsystems durch Ausschüttung entsprechender Zytokine, wie z.B. IL-2. Dies löst sowohl eine zelluläre als auch humorale Immunantwort aus. [31]

Für die Identifizierung der MHC-Peptid-Komplexe besitzen T-Lymphozyten den T-Zell-Rezeptor, mit α - und β -Ketten sowie mit jeweils einer Konstanten C- und einer variablen

V-Region. Komplettiert wird der TCR-Komplex durch CD3 und ζ -Ketten. Jeder TCR ist hoch-spezifisch für ein Epitop. [161]

1.2.2. TCR Signalvermittlung

Eine positive Ligandenerkennung und -bindung des TCR-Komplexes bewirkt die Aktivierung der T-Zelle. Zunächst werden ITAMs (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) der CD3-Ketten von Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) phosphoryliert, die dann Zap70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70) zum TCR rekrutieren. Über mehrere Phosphorylierungs- und Komplexbildungsschritte wird das TCR-Signal in verschiedene Signaltransmitter und -verstärker wie DAG (Diacylglycerol), IP_3 (Inositol-triphosphat), PKC θ (protein kinase- θ), Ras, PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) und MAPK (Mitogen-activated protein kinase) übersetzt. [83, 109]

Eine adäquate Reaktion von Seiten der T-Zelle setzt eine Veränderung der Genexpression mit vermehrter Interleukin-2-Transkription voraus. Dies wird vor allem durch die drei Transkriptionsfaktoren AP1 (Activator protein 1), NFAT (Nuclear factor of activated T cells) und NF- κ B (Nuclear factor- κ B) bewirkt, die als Folge oben genannter Signaltransmitter aktiviert und in den Zellkern transloziert werden. [75]

1.2.3. Immunsynapse

Die Bindung des TCR an den Peptid-MHC-Komplex ist der erste Schritt bei der Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen T-Zelle und antigen-präsentierender Zelle. In enger Nähe akkumulieren aktivierte TCRs mit sogenannten Microclustern aus assoziierten Signalproteinen wie Zap70 und PI3K. [109, 138] Zusammen bildet sich der cSMAC (central supramolecular activation cluster), der eine Verstärkung der Signale bewirken soll. [30] Umgeben wird der cSMAC von Integrinen wie LFA1, die den Adhäsionsring pSMAC (peripheral supramolecular activation cluster) bilden. Zur Aufrechterhaltung der Stimulation werden weitere, im pSMAC gebildete, aktivierte TCR-Komplexe kontinuierlich zum cSMAC verschoben. [19, 65, 165]

1.2.4. Zytoskelett

Die Aktivierung der T-Zelle löst eine Veränderung des Zytoskeletts aus. An der Immunsynapse findet eine rasante Polymerisation von Aktin und eine integrin-vermittelte Adhäsion statt, die eine verstärkte Bindung der T-Zelle an die antigen-präsentierende Zelle

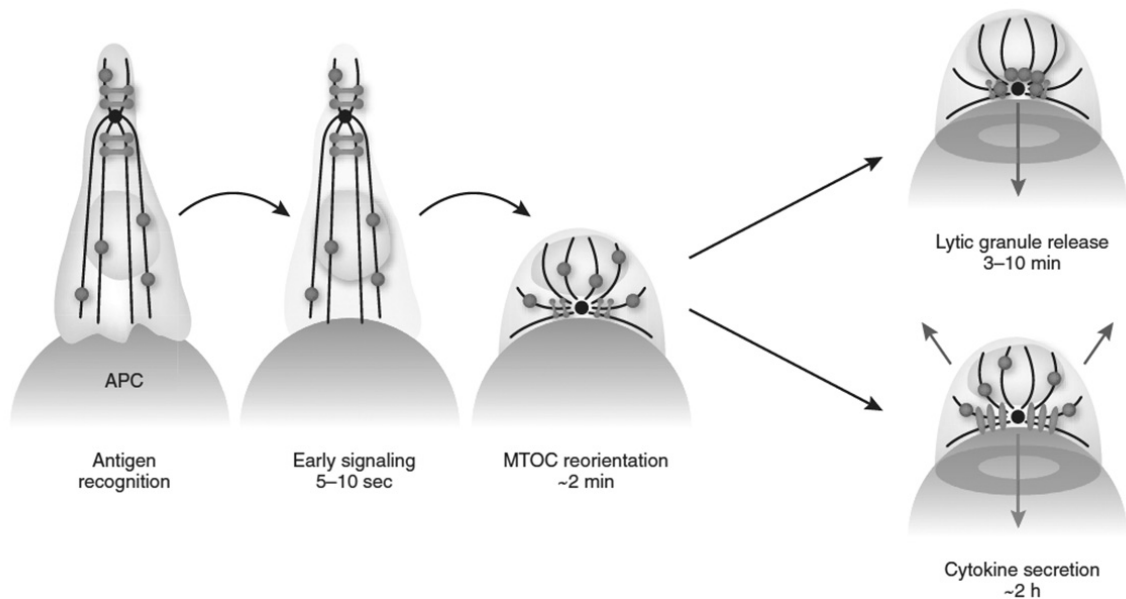


Abbildung 1.1.: Formation des „Kiss of Death“ zwischen Lymphozyt und antigen-präsentierender Zelle: Nach Antigenerkennung kommt es zu einer Zellskelett-Transformation der T-Zelle durch Polarisierung des MTOC mit anschließender Sekretion von Zytotoxinen und Zytokinen. (nach: Huse et al., 2008 [76])

und eine Vergrößerung der Kontaktfläche ermöglicht. Gleichzeitig erhöht die Phosphorylierung der MLCK (Myosin light chain kinase) die myosin-vermittelte Kontraktilität der Zelle. [13, 21]

Zur Ausbildung einer stabilen Immunsynapse gehört auch die Polarisierung des MTOC (Microtubule-organizing center), das nach TCR-Bindung direkt unter der Formation aus cSMAC- und pSMAC-Anteilen lokalisiert wird. [62] Das MTOC ist die zentrale Verbindung positiv geladener Enden von Microtubuli, deren negativ geladene Enden sich in die Peripherie der Zelle erstrecken. Dynein sorgt für die Mobilität des MTOC. Entlang dem mikrotubulären Zellskelett können lytische Granula, die Perforin oder Granzym B enthalten, zur Immunsynapse transportiert werden. Die Polarisierung erlaubt so die gezielte Sekretion von zytotoxischen Substanzen und Zytokinen in den intrazellulären Zwischenspalt. Daher nennt man die Ausbildung dieser Kontaktstelle auch den „Kiss of Death“. [12, 76, 99]

1.2.5. CD8⁺ Effektorfunktion

Die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen sind in der Lage, nach erfolgreicher Antigen-Erkennung, die Zielzelle mit zytolytischen Substanzen zu zerstören. Perforin und Granzym B sorgen

für eine Destabilisierung der Zellmembran. Über die Expression von Fas-Ligand CD95L und dessen Bindung an den Rezeptor Fas kann die Zielzelle durch Aktivierung von Caspasen zur Apoptose gebracht werden. [105] Die Sekretion von Zytokinen wie TNF- α , IL-2 oder INF- γ führt zur weiteren Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen. Zusätzlich verursacht INF- γ eine gesteigerte Expression von MHC-I-Komplexen, was es den Lymphozyten erleichtert, die Zielzellen zu identifizieren. [26]

1.2.6. Kostimulation

Die Zwei-Signal-Hypothese besagt, dass für eine optimale T-Zell-Stimulation neben dem TCR-Signal ein zweiter, kostimulatorischer Oberflächenrezeptor notwendig ist, um eine Proliferation und die Ausführung der Effektorfunktion auszulösen. [100] Bei Ausbleiben eines solchen zweiten Signals begibt sich die T-Zelle in einen Zustand der Anergie, auf den im Weiteren noch eingegangen wird, oder kann sogar apoptotisch werden. Lange war in der Forschung die Zwei-Signal-Theorie besetzt durch die Moleküle CD28 und CTLA-4.

Tatsächlich ist wohl der wichtigste Mitspieler der lymphozytäre Rezeptor CD28, der die vor allem von professionellen APCs präsentierten Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) bindet. Das CD28-Signal bewirkt eine Phosphorylierung von Src-Kinasen und dadurch eine Rekrutierung weiterer Moleküle der Aktivierungskaskade wie PI3K. Der Effekt liegt wahrscheinlich eher in einer quantitativen Steigerung des TCR-Signals, als in einer qualitativ anderen Signalvermittlung. [4, 75]

Daneben exprimieren T-Zellen auch nach Aktivierung den CD40-Liganden (CD40L), der wiederum den Rezeptor CD40 auf APCs bindet und dort wiederum zu erhöhter B7-1 und B7-2 Expression und damit verstärkter T-Zell-Stimulation führt. Ferner erfolgt eine T-Zell-Aktivierung über den Kostimulus ICOS (inducible costimulus), der an den von APCs exprimierten ICOS-Liganden ICOS-L bindet und zu Proliferation und Zytokin-Produktion auf Seiten der Lymphozyten führt. Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren noch weitere Kostimuli beschrieben, unter anderem die Familie der TNF-Rezeptoren. [34]

1.2.7. Koinhibition

Während die T-Zell-Aktivierung die oben genannte Kostimulation voraussetzt, gibt es im Sinne von Antagonisten ebenso inhibitorische Rezeptoren. Physiologischer Hintergrund der Koinhibition im Gesunden, also die Hemmung einer Immunaktivierung, ist

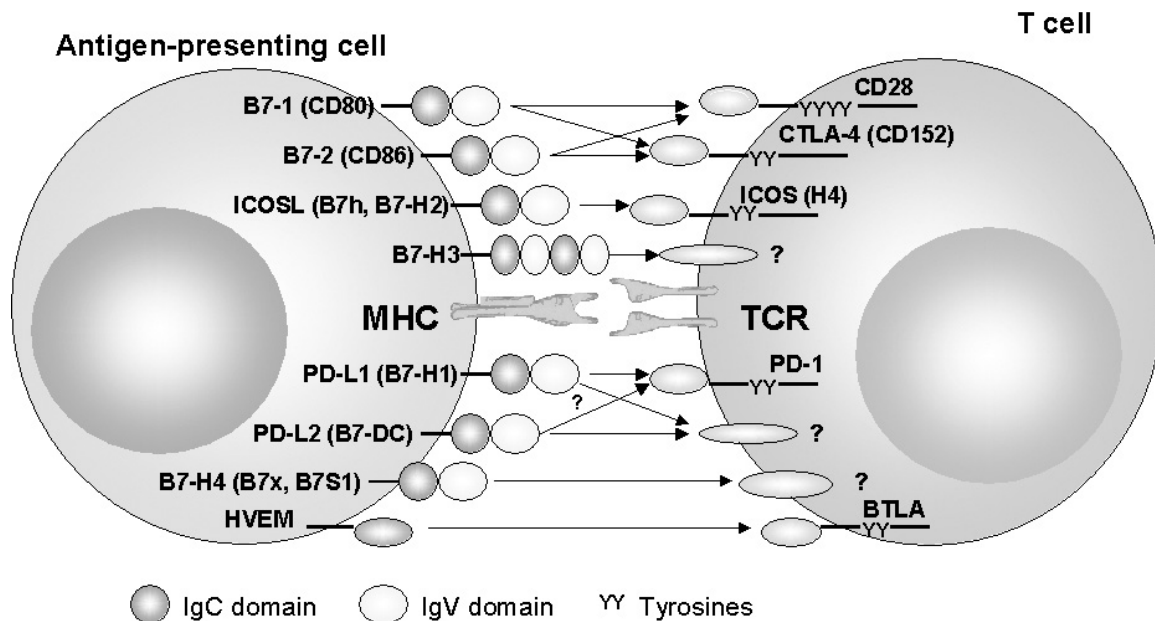


Abbildung 1.2.: Kostimulatoren der B7-Familie: Signale über CD28 und ICOS wirken kostimulatorisch, während Signale über CTLA-4 oder PD-1 koinhibitorisch in die Signalkaskade eingreifen. (nach: Blank et al., 2005 [16])

das Ziel, überschießende Immunantworten zu unterbinden bzw. im physiologischen Maße verlaufen zu lassen, da es sonst zu autoimmun vermittelten Schädigungen kommen kann.

Die Koinhibition erfolgt beispielsweise über Rezeptoren auf Lymphozyten mit sogenannten ITIMs (= Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) und über die Rekrutierung von inhibitorischen Phosphatasen wie SHP-1, die die Fortleitung des TCR-Signal unterdrücken. Beispiele für solche koinhibitorischen Rezeptoren sind CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, CD152), ein Rezeptor aus der B7-Familie, sowie BTLA (B and T lymphocyte attenuator, CD272) und PD-1 – auf letzteren wird weiter unten im Detail eingegangen.

Die Funktionsweise am Beispiel von CTLA-4: Nach T-Zell-Aktivierung wird CTLA-4 auf der Zelloberfläche hochreguliert und bindet hoch-affin Liganden, die sonst über CD28 kostimulatorisch wirken, wie z.B. B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86). [162] Es folgt wie

bei CD28 die Phosphorylierung durch Src-Kinasen und eine Kopplung mit SHP2 und PI3K. Die T-Zell-Aktivierung wird wohl durch die Dephosphorylierung membran-naher TCR-Signaltransmitter gehemmt, während zusätzlich die Bindung des Kostimulus CD28 in der Immunsynapse durch die höhere Affinität von CD80/CD86 gegenüber CTLA-4 verhindert wird. [172] Es wurde ferner das Reverse-Stop-Signal-Modell beschrieben: CTLA-4 verhindert das Stop-Signal des TCR, das die T-Zell-Motilität hemmt und damit die Zelladhäsion mit der APC ermöglicht. Die Kontaktzeit zwischen T-Zelle und APC reicht dadurch für eine effektive TCR-Aktivierung nicht aus. [137, 141] Daneben sind auch sogenannte ITSM (= Immunoreceptor tyrosine-based switch motifs) bekannt, die eine vielfältigere Rezeptor-Signal-Verarbeitung ermöglichen, da sie in Abhängigkeit der Aktivierung sowohl Kinasen als auch Phosphatasen rekrutieren können. [155] Zusammengefasst dienen diese inhibitorischen Rezeptoren dem Schutz des Organismus vor einer autogenen Schädigung. Jedoch bietet die Hemmung des Immunsystems in einem solchen Maße auch attraktive Ansatzpunkte für pathologische Vorgänge. Es ist z.B. auffällig, dass der Ligand für PD-1, PD-L1, vermehrt auf Tumorzellen sowohl in Tiermodellen als auch im Menschen nachgewiesen werden konnte. Es ist also naheliegend, dass es zu einer Interaktion zwischen Tumorgewebe und Immunsystem kommen muss.

1.3. Tumorgenese und Immunsystem

Hanahan und Weinberg haben in zwei Übersichtsarbeiten die Markenzeichen der Tumorentstehung („Hallmarks of Cancer“) zusammengefasst: Aufrechterhaltung von proliferativen Signalen, Vermeidung von Wachstumshemmnissen, Widerstand gegenüber dem Zelltod, Erlangung von replikativer Unsterblichkeit, Induktion von Gefäßbildung und Aktivierung von Invasion und Metastasierung („sustaining proliferative signaling, evading growth suppressors, resisting cell death, enabling replicative immortality, inducing angiogenesis, and activating invasion and metastasis“). Darüber hinaus und für diese Arbeit von existentieller Bedeutung ist der Einfluss des Immunsystems und damit das Ziel des Tumors, eben diesem zu entgehen. [70, 71]

Die Theorie einer fortwährenden Immunosurveillance, also der Überwachung des Organismus mit Suche und Begrenzung von Zellveränderungen durch das Immunsystem, wurde erstmals Anfang des 20. Jahrhunderts von Paul Ehrlich formuliert. [48] Diese wurde später von Thomas und Burnet um die Hypothese von immunogenen Tumorantigenen und der dadurch ermöglichten, frühzeitigen Tumorabstoßung erweitert. [23, 22, 123] Es konnte weiterhin in Mausmodellen gezeigt werden, dass sowohl die Absenz von T-Zellen

als auch ein Defekt im IFN- γ -Rezeptor mit erhöhter Inzidenz an Neoplasien einhergeht. [84]

Für die Immunosurveillance werden drei Stadien postuliert: die Vernichtung des Tumors (Elimination), das Gleichgewicht (Equilibrium) und die Immunflucht (Escape). Die Elimination des Tumors setzt die Erkennung voraus, sowohl durch die angeborene als auch durch die adaptive Säule des Immunsystems. Es schließt sich die Aktivierung des Immunsystems mittels Zytokinen, Antigen-Präsentation in den drainierenden Lymphknoten, Bildung von tumor-antigen-spezifischen T-Zellen und schließlich deren Einwanderung in den Tumor an. [46, 149] Daneben kommen auch nicht immunogene Kontrollsysteme wie intrinsische DNA-Reparatur oder Apoptose nach DNA-Schädigung zur Geltung.

Wenn aber die Elimination nicht vollständig erfolgreich ist, kommt es häufig zur Selektionierung von Tumorzellen. Dies bedeutet, dass Tumorzellen überleben, die aufgrund einer geringeren Immunogenität der Abstoßung durch das Immunsystem entgehen, oder die aufgrund des Selektionsdrucks Kontrollmechanismen der Zellproliferation überwinden konnten. Solange sich also Schutzmechanismen und tumor-abstoßende Immunreaktion sowie die Weiterentwicklung des Tumorgewebes die Waage halten, spricht man von der Phase des Equilibriums.

Kann die Immunreaktion das Wachstum des Tumors und dessen Metastasierung schließlich nicht mehr im Rahmen halten, spricht man von Immunescape. [91]

1.3.1. Tumor-Antigene

Gesunde Zellen werden bezüglich Lebensdauer, Wachstum, Funktionsweise und Zellteilung dergestalt reguliert, dass sie ihren spezifischen Zweck im Organismus erfüllen und sich im Gleichgewicht mit anderen Zellarten befinden. Jede Zelle präsentiert auf ihrer Oberfläche Strukturen, sogenannte Antigene, die zur Erkennung und Kommunikation mit anderen Zellen dienen. Diese Antigene können aus Proteinen, Lipiden oder Kohlenhydraten bestehen.

Bei Malignomen ist die Zell-Steuerung defekt, was zu unbändigem Wachstum, der Infiltrierung gesunden umliegenden Gewebes und der Bildung von Metastasen an anderer Stelle führen kann. Tumore sind also Fremdkörper aus körpereigenen Zellen. Dies erschwert die Erkennung als Pathogen, da das Antigen-Profil der Tumorzellen dem von gesunden Zellen stark ähnelt.

Charakteristische Antigene auf Tumoren stellen hingegen einen Ansatzpunkt für das Immunsystem und damit auch Immuntherapien dar. Man kann diese Antigene hinsichtlich Ursprung und Art unterscheiden: [35]

Tumor-spezifische Antigene sind Folge von DNA-Mutationen, Spleiss-Varianten oder chromosomaler Translokationen. Deren Genprodukte werden auf der Zelloberfläche präsentiert und können dort von Immunzellen als fremd erkannt werden, da diese Antigene in gesunden Körperzellen nicht vorkommen. Ein Beispiel hierfür ist das Prostata-spezifische Antigen PSA. Auch können Strukturen, die eigentlich nur in der Embryogenese oder bei der Differenzierung eine Rolle spielen und in reifen Geweben supprimiert werden, durch gestörte Zellprozesse von Tumoren wieder produziert und exprimiert werden, beispielsweise HER-2/neu. [10, 18]

Zu den tumor-assoziierten Antigenen gehören Proteine, die im Organismus bereits bekannt sind: Gewebe-spezifische Differenzierungsantigene kommen nur in einer bestimmten Gewebeart vor, jedoch auf gesunden wie auch auf Tumorzellen. Ein Beispiel ist MART1/Melan-A, das von Melanozyten und Melanomen exprimiert wird. Auf ähnliche Weise kann eine Störung der Gen-Steuerung zu einer verstärkten oder aberranten Expression von Proteinen führen, die von gesunden Zellen zwar auch produziert, aber in deutlich geringerer Konzentration exprimiert werden. [124]

Besonders tumor-spezifische, aber auch tumor-assoziierte Antigene stellen also ein potentielles Ziel für die Immunabwehr dar.

1.3.2. Immunantwort

Die Schritte einer effektiven Tumor-Immunantwort beginnen mit der Erkennung eines Tumorantigens. Im Folgenden besteht die resultierende Antwort – neben dem angeborenen Immunsystem mit z.B. Natürlichen Killerzellen – u.a. aus der klonalen Expansion von CD8⁺ T-Zellen mit Spezifität für ein tumor-assoziiertes Epitop, oder auch aus der Produktion tumor-spezifischer Antikörper. [80, 163] Man kann die Reaktion des Immunsystems auf einen Tumor in zwei Phasen aufteilen. In den sekundären Lymphorganen, z.B. den Lymphknoten, findet mittels Antigen-präsentierender Zellen die „Priming“-Phase statt, in der T- und B-Zellen oder auch Makrophagen geschult werden. Im Tumor selbst kommt es zur „Effector“-Phase, in der die tatsächliche Antwort auf die Tumorzellen abläuft. Für Letztere müssen aktivierte Effektor-T-Zellen an und in die Tumorstelle wandern und Kontakt zu Antigen-exprimierenden Tumorzellen herstellen, um dann – die volle Funktionalität vorausgesetzt – die Abstoßung und Vernichtung der Tumorzellen durchzuführen. [59] Insgesamt besteht der Ablauf der lymphozytären Reaktion initial aus der Aktivierung, dann der Expansion eben dieser aktivierten spezifischen Lymphozyten, der Effektorantwort im Sinne der Tumorlyse (was jedoch die Überwindung einer möglichen Immunsuppression erfordert), sowie der Ausbildung von Memory T-Zellen.

Die Migration oder das sogenannte „Homing“ von aktivierten T-Zellen in Tumorgewebe kann in einigen Krebsarten wie Melanomen, Kolon- oder Ovarkarzinomen spontan beobachtet werden. Die Beobachtung dieser lymphozytären Infiltration war der Grundstein für die Forschung mit adoptiver T-Zell-Therapie, bei der tumor-spezifische T-Zellen *ex vivo* kultiviert und anschließend in den Patienten re-infundiert werden. [45, 59] Auch wenn einige Tumorarten zu einer Rekrutierung von CD8⁺ T-Lymphozyten führen, konnten bislang in den meisten Tumormetastasen diese Infiltrate nicht beobachtet werden. Eine wichtige Rolle bei der effektiven Anlockung von Immunzellen spielen Chemokine, wie z.B. MCP-1, MIP-1 α , IP-10 und Gamma-Interferon (IFN- γ).

1.3.3. Tumor Immunescape

Die exakten Vorgänge, mit denen der Tumor sich dem Immunsystem entzieht, sind noch nicht vollständig verstanden. Es wird postuliert, dass neben den Tumorzellen selbst auch das zelluläre Umfeld, das Tumor-Microenvironment, zur Immunescape beiträgt. [59, 60, 179] Generell stehen dem Tumor zwei Wege zur Verfügung: sich nicht zu erkennen zu geben oder sich aktiv selbstzuverteidigen, durch Hemmung der Immunaktivierung oder durch Abwehr bereits aktivierter tumorspezifischer Zellen. Dem gegenüber steht das Phänomen von tumor-assoziierten Entzündungsreaktionen, die bei manchen Tumorarten der Tumorgenese vorausgehen, in anderen Fällen z.B. durch Zytokin-Produktion Teil der Tumorproliferation sind. [27] Daneben sind die bereits oben genannten Mechanismen im Sinne der „Hallmarks of Cancer“ natürlich essentiell für die Tumorpersistenz.

1.3.3.1. Hemmung der Tumorerkennung

Sich dem Zugriff des Immunsystems zu entziehen, beginnt damit, dass manche Tumoren eine mechanische Hürde, nämlich eine Kapsel, ausprägen, die den Zugang von Immunzellen und dadurch die Erkennung des Tumors durch das Immunsystem verhindern.

Die verminderte Expression von MHC-I-Komplexen auf Tumoren wurde in mehreren Modellen beschrieben. Die MHC-Veränderung reduziert die Erkennung und Vernichtung durch CD8⁺ zytotoxische T-Zellen. [122] Die eingeschränkte Expression kann durch Genmutationen, die bei der Karzinogenese vorkommen, oder auch durch defekte Regulation und Prozessierung der MHC-Antigene verursacht sein. In kolorektalen Karzinomen konnte beispielsweise eine β 2-Mikroglobulin-Mutation und eine Herabregulierung von LMP7/TAP2 als Auslöser des MHC-I-Verlusts identifiziert werden. [25] Daneben wurde der Verlust von MHC-I nach Immuntherapie in einem Mausmodell beschrieben, der

durch *ex vivo* Kultivierung wieder rückgängig gemacht werden konnte und somit eventuell vom Tumor-Microenvironment beeinflusst wird. [6]

Veränderte Expression von tumor-assoziierten Antigenen ist ein weiterer Mechanismus, mit dem sich Tumorzellen dem Zugriff von antigen-spezifischen Immunzellen entziehen. Derartige Herunterregulierungen oder komplette Antigen-Verluste können unabhängig von der MHC-Veränderung auftreten und sind in einem Tumor oftmals heterogen verteilt. [88] Beispielsweise konnte der Verlust vom tumor-assoziierten Antigen MART-1 mit einer Tumorprogression in Korrelation gesetzt werden. [40] Ebenso wie der MHC-Verlust tritt der Antigenverlust v.a. nach initialer Immunreaktion oder Immuntherapie auf, im Sinne einer Selektionierung.

In humanen Pankreas-Karzinomen wurde der Verlust der CD3 zeta-Kette (CD247) in tumor-infiltrierenden Lymphozyten beobachtet. [167] Da diese Kette Teil des TCR-CD3-Komplexes und damit des TCR-Signalweges ist, führt das Fehlen von CD3 zeta zu verringerter T-Zell-Funktionalität. Das Auftreten dieser Veränderung konnte u.a. in Korrelation mit erhöhten Konzentrationen von IL-10 gesetzt werden. [6]

Die Steuerung der Zellbiologie in gesunden Organismen erfolgt unter anderem über Apoptose, also den gesteuerten Zelltod. Dieser wird z.B. über Fas, den Rezeptor für den Fas-Liganden FasL, oder über TRAIL-Rezeptoren (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors) vermittelt. In Tumoren konnte, um diesen Zelltod-Signalen zu entgehen, veränderte Expressionsmuster der Rezeptoren aber auch beteiligter Proteine wie cFLIP beobachtet werden.[37, 106] Gleichzeitig nutzen manche Tumoren wie z.B. Zervix-Adenokarzinome die Expression des Fas-Liganden, um Immunzellen in die Apoptose zu bringen und sich selbst vor der Vernichtung zu schützen. [85]

1.3.3.2. Inhibition und Einfluss durch Faktoren, Chemokine und Liganden

Des Weiteren produzieren Tumore und ihr Microenvironment Zytokine und Chemokine, die das Immunsystem modulieren. Hervorzuheben sind Interleukin-10 (IL-10), Transforming Growth Factor β (TGF- β) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). [98] In nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen konnte beispielsweise ein Übergewicht von immun-inhibitorischen Botenstoffen im Vergleich zu Immun-Stimulanzen festgestellt werden. [104]

VEGF fördert nicht nur die Gefäßeinsprossung und Blutversorgung des wachsenden Tumors, sondern verhindert auch die Differenzierung von dendritischen Zellen, blockiert den Transkriptionsfaktor NF- κ B und hemmt damit die Immunantwort. [103, 121]

IL-10 wirkt als immun-inhibitorisches Zytokin, indem es die Antigen-Präsentation in

Dendritischen Zellen und dadurch die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen verhindert, sowie die Produktion von IL-12 hemmt. [39, 153] Es konnte auch gezeigt werden, dass bereits die Rekrutierung von DCs unter IL-10 inadäquat ist.

TGF- β spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus samt Zellteilung und -differenzierung. Beispielsweise löst die Bindung von TGF- β an den Rezeptor mittels Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAP-Kinase) die Apoptose der Zelle aus. Außerdem inhibiert TGF- β die Aktivierung von Lymphozyten. [64] Bei der Tumorgenese kommt es oftmals zu einer Mutation des TGF- β -Signalweges, so dass eine Kontrolle des Zellzyklus und der Proliferation misslingt. [90] Gleichzeitig führt eine verstärkte Sekretion von TGF- β zur Angiogenese, zur Produktion von IL-10 und zur Aktivierung immuninhibitorischer regulatorischer T-Zellen. [17, 126]

Zuletzt können Tumoren sich direkt gegen antigen-spezifische T-Zellen verteidigen, indem sie inhibitorische Moleküle wie CTLA-4 (siehe oben, Koinhibition) oder PD-L1 exprimieren. [41]

1.3.3.3. Fehlen von Kostimuli

Trotz Anwesenheit von tumor-spezifischen Immunzellen und Expression von MHC und Antigenen können viele Tumore proliferieren. Dies kann am Fehlen von kostimulatorischen Signalen liegen, die notwendig für die T-Zell-Aktivierung sind, wie z.B. CD28 als Rezeptor für CD80 und CD86. Entsprechend der Zwei-Signal-Hypothese treten T-Zellen bei Ausbleiben der Kostimulation in den Zustand der Anergie ein und der Tumor erreicht so eine antigen-spezifische Toleranz. [3, 143]

1.3.3.4. Zelluläre Inhibitoren

Als Kontrollinstanz des Immunsystems existieren sogenannte regulatorische T-Zellen, kurz Tregs, eine T-Zell-Subpopulation mit charakteristischer Expression von CD4, CD25 (IL-2 Rezeptor) und FoxP3. Sie sollen überschießende Immunantworten und eine Aktivierung von weiteren T-Zellen bremsen. Während dieser Mechanismus Autoimmun-Schäden verhindert, stellt es einen Fluchtmechanismus für Tumoren dar und ermöglicht deren Progression. [139, 159] Beispielsweise konnten erhöhte Konzentrationen von TGF- β sezernierenden Tregs in Tumordinfiltraten von epithelialen Malignomen und deren immuninhibitorische Wirkung nachgewiesen werden. [160, 171]

1.4. Tumor-infiltrierende Lymphozyten

Untersuchungen von Tumorproben konnten die Existenz von tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) und deren Antigen-Spezifität nachweisen. Dennoch resultiert diese Aktivierung des Immunsystems nicht immer in einer erfolgreichen Abstoßung des Tumors. Auch in Experimenten *ex vivo* waren die TILs oftmals unfähig, zytotoxisch zu wirken. [67, 136] Die Sekretion von zytolytischen Substanzen wie Perforin oder Granzym B, sowie die Fähigkeit, Zielzellen zu erkennen und an diese zu binden, war reduziert. Daneben wurden in TILs auch verminderte Zytokin-Produktion und Proliferation beobachtet. [132]

Die mangelhafte Perforin-Produktion könnte dabei im natürlichen Zellzyklus begründet sein: nach der kompletten Veräußerung vorhandener zytolytischer Speichergranula ist vor erneuter toxischer Funktionalität die Regeneration im Sinne des Zellzyklus notwendig. [59] Dafür sprechen die Ergebnisse von Experimenten, in denen *ex vivo* eine starke T-Zell-Aktivierung erreicht wurde über Bindung von CD3/CD28, und die eine zunehmende Granula-Expression in Memory-Zellen und TILs zur Folge hatte. [60, 107]

1.4.1. Anergie

Man spricht vom Übergang der T-Zelle in den Zustand der Anergie, wenn der T-Zell-Rezeptor sein Antigen erkennt und darüber aktiviert wird, eine Kostimulation z.B. über CD28 aber ausbleibt. Da auch eine erneute Erkennung des Antigens im Sinne einer Restimulation oder ein späterer Kostimulus die Anergie nicht wieder aufheben kann und kein IL-2 produziert wird, sind derartig anerge Lymphozyten nicht in der Lage – trotz ihrer Antigenspezifität – eine effektive Abstoßung herbeizuführen. [50, 150, 164]

Gajewski setzte ein Mausmodell mit 2C T-Zell-Rezeptor transgenen T-Zellen ein, bei der die Stimulierung der T-Zellen ausschließlich über das allo-antigene MHC L^d ohne eine B7-vermittelte Kostimulation ablief. Phänotypisch waren die T-Zellen nach Tumorkontakt mit einer hohen CD44-Expression aktiviert, jedoch waren die T-Zellen *ex vivo* nach TCR/CD28-Stimulation nicht in der Lage, Zytokine zu produzieren. Die Kultivierung mit Phorbolmyristat-Acetat und Ionomycin (PMA/I), das die proximale Signalübermittlung des T-Zell-Rezeptors umgeht, führte zur normalen Zytokin-Ausschüttung, was dem Verhalten klassisch anergischer Lymphozyten entspricht. [51, 59]

1.4.2. Exhaustion

Rafi Ahmed beschrieb die funktionelle Erschöpfung von T-Zellen in chronischen Infektionen, die sogenannte „Exhaustion“. [176] Diese führt zum zunehmenden Verlust der Zytokin-Produktion von IL-2, TNF- α und IFN- γ , sowie der Zytotoxizität *ex vivo*. [89] Ebenfalls war die Reaktivität auf IL-7 und IL-15 vermindert. [169] „Exhausted“ CD4⁺ T-Zellen produzieren weniger IL-2 und TNF- α , dafür größere Mengen des immunsuppressiven IL-10. [20] Gen-Analysen legten Veränderungen in „exhausted“ T-Zellen offen, die v.a. Transkriptionsfaktoren und für Chemotaxis und Migration notwendige Genexpressionen betreffen. Außerdem zeigten sich Defizite im Zellmetabolismus und Energiehaushalt. Ein besonderes Merkmal ist die hohe Expression von PD-1, auf das später noch eingegangen wird. [170]

Tumor-infiltrierende T-Zellen demonstrieren in Tumoren mit hoher Antigendichte ein vergleichbares Verhalten wie virus-spezifische T-Zellen bei chronischen Infektionen, mit vergleichbarem Verlust der Effektorfunktion und ähnlichem Phänotyp. [89]

1.4.3. Defekte in T-Zell-Signal und MTOC-Polarisierung

Frey et al. untersuchten im Mausmodell den Mechanismus der TCR-Signal-Blockade als Ursache für ineffektive Tumorabstoßung. Direkt nach Gewinnung von Lymphozyten aus Tumormaterial war die lytische Funktion *in vitro* aufgehoben. Mikroskopische Analysen zeigten, dass die TILs nicht in der Lage waren, lytische Granula und den MTOC an die Immunsynapse mit Zielzellen zu polarisieren. [133] Der Defekt wurde auf die Blockade des antigen-abhängigen TCR-Signals zurückgeführt. [93] Damit einher ging auch eine verringerte Adhäsion der TILs an die Tumorzellen. [92] Initiale TCR-Signale führten zur raschen Aktivierung und Verschiebung von inhibitorisch wirksamen SHP-1-Phosphatasen. Nach Kultivierung *ex vivo*, ohne Tumorkontakt, konnten die TILs die Blockade des TCR-Signalwegs und damit ihre Funktionalität wiedergewinnen. Ebenso führte aber auch die erneute Kokultivierung mit Tumorzellen zu einem erneuten Funktionsverlust. Daraus postulierten Frey et al. einen schnell wirksamen Inhibitor, der nach Antigen-Erkennung aktiv wird. [166]

1.5. Programmed Death Receptor 1 (PD-1)

1.5.1. Struktur, Vorkommen und Signalwirkung

Programmed Death Receptor 1 (PD-1) wurde erstmalig 1992 in einem T-Zell-Hybridom beschrieben, dessen Zellen sich in der Apoptose, dem programmierten Zelltod, befanden. Hierbei wurde das PD-1 kodierende Gen *Pdcd1* hochreguliert [77]. *Pdcd1* liegt bei Mäusen auf Chromosom 1 und bei Menschen auf Chromosom 2 und enthält 5 Exons. Das daraus kodierte Protein aus 288 Aminosäuren gehört zu den Typ I Transmembran-Proteinen. Die Struktur setzt sich zusammen aus einer extrazellulären IgV-ähnlichen Immunglobulin-Domäne, einer Verbindungsdomäne, einer Transmembran-Domäne sowie einer Intrazellulär-Domäne, die zwei Tyrosin-gebundene Signalmotive trägt: Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) und Immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM). [66, 101]. Aufgrund diesen Designs, das in ähnlicher Form bei CD28, ICOS und CTLA-4 vorherrscht, wurde PD-1 zu der CD28-Familie gezählt. Allerdings bestehen klare Unterschiede: CD28-Mitglieder existieren meist als Dimere, während PD-1 als Monomer exprimiert wird. Auch die Anordnung von ITIM und ITSM sind so nicht in CD28-Proteinen zu finden. [118]

Exprimiert wird PD-1 auf der Zelloberfläche von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, B-Zellen, Natürlichen Killer (NK) T-Zellen, aktivierten Monozyten sowie dendritischen Zellen (DC). Ruhende, naive T-Zellen exprimieren kein PD-1, die Expression ist aber durch Aktivierung induzierbar [5, 77, 113] und wird durch Anwesenheit von Tumornekrose-Faktor TNF verstärkt. [118]

Die Ligandenbindung am extrazellulären Teil von PD-1 führt zur Phosphorylierung der zwei Tyrosin-Reste auf der intrazellulären Seite. Daraufhin wird die Phosphatase SHP-2 (Src homology 2-containing tyrosine phosphatase 2), sowie in geringerem Maße SHP-1 an die Zytoplasma-Domäne gebunden, wo sie bei gleichzeitiger Aktivierung des T-Zell-Rezeptors Zwischenprodukte der TCR-Signalkette wie Syk und Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3K) dephosphorylieren und damit inaktivieren können. [119, 146] Dadurch wird die Phosphorylierung des Moleküls Akt, das PI3K bei der Signalübertragung folgt, verhindert. Ebenfalls inhibiert wird die Phosphorylierung von CD3- ζ , ZAP70 und PKC- θ sowie die Aktivierung von Erk [86, 125]. SHP-1 ist bekannt als negativer Regulator der Zellaktivierung, während SHP-2 einerseits im Zusammenhang mit Zellaktivierung durch Hemmung von negativen Regulatoren mittels Dephosphorylierung, als auch negativer Beeinflussung von IL-6 und dem Wachstumshormon GH beschrieben wurde. PI3K-Aktivierung und nachfolgend Phosphorylierung von Akt (Proteinkinase B) resul-

tieren in einer erhöhten Expression von Glucosetransportern in der Zellmembran und in erhöhter glykolytischer Enzymaktivität. Diese Bereitstellung von Energie ist die Grundlage für die aktivierte Zelle, Effektorfunktionen zu übernehmen und proliferieren zu können. [53] Die Blockade dieser Signalkette führt demnach zur Reduktion des Glucose-Stoffwechsels, aber auch der Genkodierung von Bcl-xL, einem Apoptose-hemmenden Protein. [134] Ferner resultiert die PD-1-vermittelte Zellhemmung in reduzierter Zytokin-Produktion (v.a. IFN- γ , TNF- α und IL-2) und in geringerer zellulärer Proliferation. Der inhibitorische Effekt ist dabei indirekt proportional zur Stärke der TCR-Stimulation, kann aber auch durchbrochen werden, v.a. wenn es zu einer STAT5-Aktivierung kommt, wie es bei IL-2, IL-7 und IL-15 Signalen der Fall ist. [11, 29, 55] Auch Stimulierung mittels CD28, das zur Zellexpansion und zur Aktivierung von anti-apoptotischen und zytokin-encodeierenden (IL-2, IFN- γ) Genen führt, kann der Hemmung durch PD-1 entgegenwirken. [55]

1.5.2. PD-1-Liganden und zweiter Rezeptor

Es sind zwei Liganden für PD-1 beschrieben. Programmed Death Receptor 1 Ligand 1, kurz PD-L1 (B7-H1; CD274) ist wie PD-1 ein Typ I Transmembran-Protein mit einer Länge von 290 Aminosäuren. Das auf Chromosom 19 (Maus) bzw. 9 (Mensch) befindliche Gen Cd274 besteht aus 7 Exons und kodiert für eine IgV- und eine IgC-Domäne. Das Molekül hat eine weite Verbreitung auf hämatopoetischen sowie nicht-hämatopoetischen Zellen. [42, 55] Es kommt vor auf T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen, mesenchymalen Stammzellen, Knochenmark-entstammenden Mastzellen, vaskulärem Endothel, Epithel, Keratinozyten, Muskelzellen, Hepatozyten, Pankreasinseln, Astrozyten, in der Plazenta und auf der Cornea des Auges. [49, 142, 173] Die Anwesenheit von IFN- α , - β und - γ aber auch IL-10 triggert eine verstärkte Expression von PD-L1. [145]

PD-L2 (B7-DC; CD273) wird durch das Gen Pdcd1lg2 (7 Exons) kodiert und ist ebenfalls ein Typ I Transmembran-Protein, zeigt aber eine deutlich geringere Verbreitung im Vergleich zu PD-L1. Es ist hauptsächlich auf dendritischen Zellen, Makrophagen und kultivierten Knochenmark-abstammenden Mastzellen zu finden. [111] PD-L2 trägt wie PD-L1 extrazellulär eine IgC- und IgV-Domäne. PD-L2 wird nach Stimulierung durch IL-4, NF- κ B, IFN- γ und GM-CSF (Granulocyte/Monocyte Colony-Stimulating Factor) aufreguliert. [127]

Ferner konnte ein zweiter Rezeptor für PD-L1 identifiziert werden. Es handelt sich mit B7-1 (CD80) um ein bereits bekanntes Mitglied der B7-Superfamilie. B7-1 bindet PD-

L1 mit einer höheren Affinität als PD-1/PD-L1, jedoch mit einer geringeren Affinität als B7-1/CD28. PD-L1 kann somit sowohl über PD-1 als auch über B7-1 inhibitorisch wirken. [24, 86]

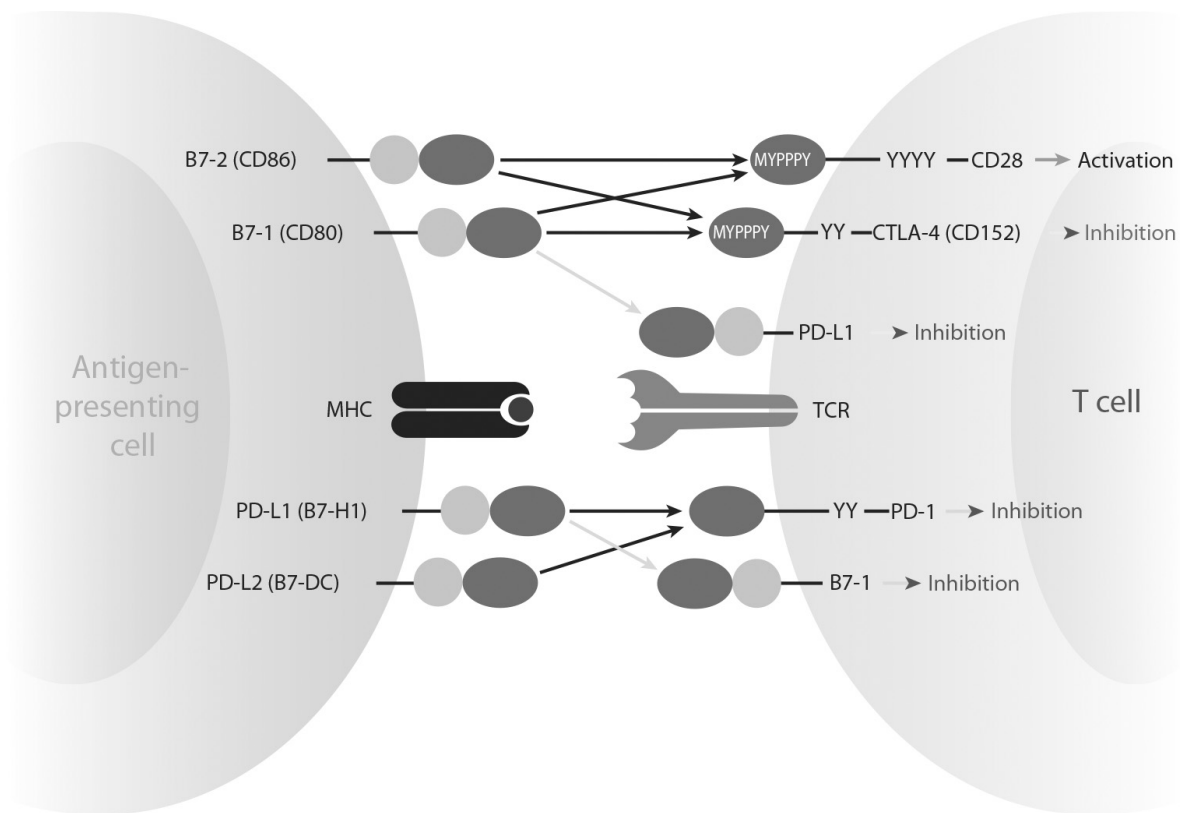


Abbildung 1.3.: Ligandenpaare der B7-Familie zwischen T-Zelle und APC: PD-1-Aktivierung bzw. PD-L1-Bindung führen zur T-Zell-Inhibition. (nach: Keir et al., 2008 [86])

1.5.3. PD-1 und Autoimmunität

Die Bildung zentraler Toleranz des Immunsystems im Thymus wird von PD-1 Signalen beeinflusst, wobei sowohl die positive als auch die negative Selektionierung reifender Thymozyten betroffen ist und das Fehlen von PD-1 oder seinen Liganden zu veränderten Phänotypen der Lymphozyten führt. [14, 87, 114]

Auch bei der peripheren Toleranz ist PD-1 beteiligt: entgehen T-Zellen, die eine zu hohe Eigen-Reaktivität haben, der Selektionierung im Thymus, so können diese über PD-1/PD-L1-Interaktion gehemmt werden. Dies bedeutet umgekehrt, dass das Fehlen von PD-1 zu einer defekten Regulierung der Autoimmunität führt.

In Modellen konnte der Einfluss von PD-1 auf Autoimmun-Erkrankungen gezeigt werden. PD-1 defiziente C57BL/6 Mäuse entwickelten beispielsweise Glomerulonephritiden,

während Balb/c Mäuse ohne das *Pdcd1*-Gen an autoimmun-dilativen Kardiomyopathien erkrankten. [116, 117] Die Antikörper-Blockade von PD-1 verursachte eine Exazerbation des autoimmun-vermittelten Diabetes mellitus. [8] Ebenso nahmen entzündliche Infiltrate im zentralen Nervensystem im EAE-Mausmodell – für Multiple Sklerose – zu, wenn anti-PD-1 oder anti-PD-L2 Antikörper verabreicht wurden. Dies zeigt, dass sich eine auto-immun vermittelte Erkrankung wie die Multiple Sklerose bzw. EAE im Tiermodell bei defekter PD-1-abhängiger Immunregulierung verschlechtert aufgrund einer überschießenden Immunreaktion. Hingegen verbesserten dendritische Zellen, die PD-L1 überexprimieren, die auto-immune Enzephalitis und konnten die Inflammation eindämmen [74].

Eine punktuelle Veränderung der *Pdcd1*-Genstruktur, ein sogenannter Single nucleotide polymorphism (SNP) wird assoziiert mit dem Auftreten von systemischem Lupus erythematodes, Diabetes mellitus Typ I und Encephalitis disseminata [97, 130].

1.5.4. PD-1 in Infektion und Exhaustion

Auch virale und bakterielle Infektionen führen im idealen Fall zu einer Erkennung und Vernichtung des Pathogens durch das Immunsystem. PD-1 vermittelte T-Zell-Inhibition kann jedoch bei der Etablierung chronischer Infektionen eine Rolle spielen. [169] Eine hohe PD-1-Expression auf HIV-spezifischen $CD8^+$ Lymphozyten korreliert beispielsweise mit einer erhöhten Viruslast und reduzierter $CD4$ -Zahl. [44] Versuche, die PD-1-Inhibition mit Antikörper-Therapie oder PD-1 defizienten T-Zellen zu durchbrechen, führten allerdings nicht nur zu verbesserter Immunantwort bei HIV, Hepatitis B und C, HTLV, *Helicobacter pylori* und weiteren Erkrankungen, sondern auch zu Schädigung von gesundem Gewebe. [79]

Ahmed et al. konnte im LCMV-Mausmodell zeigen, dass in akuten Infektionen virus-spezifische $CD8^+$ T-Zellen anfangs PD-1 exprimierten, nach Ausheilung PD-1 herabregulierten, und im Folgenden virus-spezifische Gedächtniszellen bildeten. Die chronische Infektion hingegen führte zu konstanter, im Verlauf nicht rückläufiger Expression von PD-1 auf T-Zellen, die zwar virus-spezifisch, nach einiger Zeit aber nur noch mono-funktionell (entweder Produktion von $IFN-\gamma$ oder $TNF-\alpha$) waren. 80 Tage nach Infektion waren die T-Zellen größtenteils unfunktionell, „exhausted“. Wurde in diesen Tieren der PD-1/PD-L1-Signalweg durch Zugabe von Antikörpern blockiert, konnte eine Wiederherstellung der Effektorfunktion und eine verbesserte Viruskontrolle beobachtet werden. [9, 170]

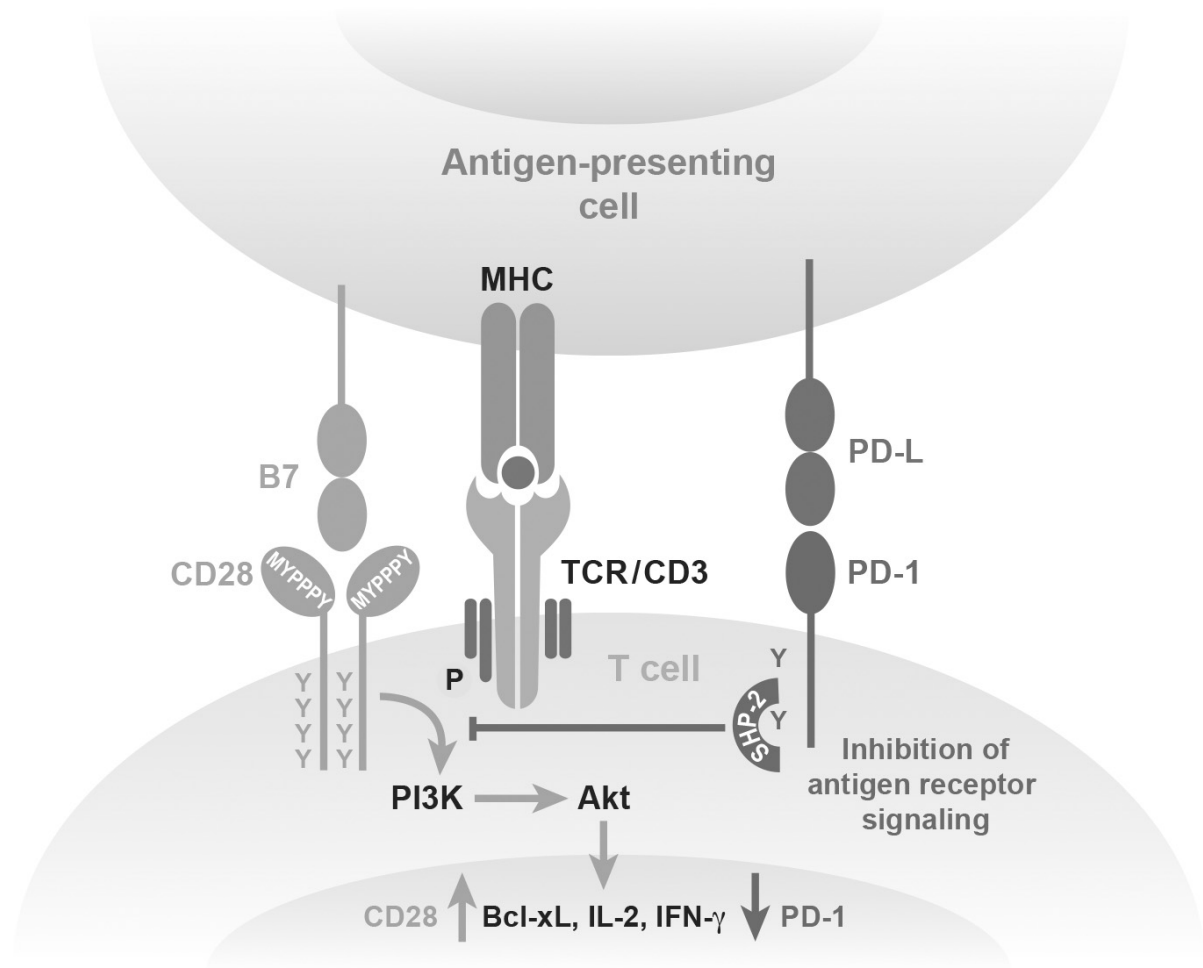


Abbildung 1.4.: Signalwirkung von PD-L1: Ligandeninteraktion von PD-L1/PD-1 führt zu einer Unterbrechung der Antigenrezeptor-Signalkaskade und damit zu einer Hemmung der T-Zell-Funktionalität. (nach: Keir et al, 2008 [86])

1.5.5. PD-1 und Tumore

Eine besonders ausgeprägte Rolle spielt die Interaktion zwischen PD-L1 und PD-1, wie oben bereits erwähnt, als Mechanismus des Immunescape von Tumoren.

PD-L1 wird in einer relativ großen Anzahl verschiedener Tumorgewebe exprimiert, wie z.B. in Malignomen in Brust, Lunge, Colon, Ovar, Haut (Melanome), Blase, Leber, Magen, Gehirn (Gliome), Niere, Pankreas und Thyreoidea. In Ovarkarzinomen hemmt PD-L1 die Fähigkeit von $CD8^+$ T-Zellen, in das Tumorgewebe einzuwandern. In Myelomen korreliert die PD-L1-Expression mit einer schlechteren Prognose. Vergleichbare Aussagen wurden zu Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Magen- und Nierenzellkarzinomen veröffentlicht. [95, 158] In anderen Veröffentlichungen divergieren die Ergebnisse hinsichtlich PD-L1-Expression auf Tumorzellen und prognostischer Relevanz, wie es die

Veröffentlichungen von Hino et al. (2010), Gadiot et al. (2011) und Taube et al. (2012) demonstrieren. [57, 72, 156]

Im Tiermodell verhindert PD-L1 auf Tumoren die Aktivierung von T-Zellen und damit die Tumorzell-Lyse; in manchen Fällen kommt es zur vermehrten Apoptose von tumorspezifischen T-Zellen. [41, 69]

Die Blockade des PD-1/PD-L1-Signalwegs führt *in vitro* zu einer verbesserten T-Zell-Aktivierung [36, 41, 86, 95, 157]. *In vivo* führt der Einsatz von blockierenden anti-PD-L1 Antikörpern bei Mäusen sowie ein PD-1 defizienter Genotyp zu verbesserter Antitumor-Immunantwort, teilweise mit kompletter Tumorabstoßung. [15, 73, 78]

Auch tumor-assoziierte dendritische Zellen können PD-L1 auf ihrer Oberfläche hochregulieren. Die Blockade mittels eines murinen anti-PD-L1 Antikörper kann hierbei die DC-vermittelte T-Zell-Aktivierung verbessern. [36]

Die Analyse von tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) zeigte in Untersuchungen, dass TIL im Vergleich zu Lymphozyten in gesundem Gewebe oder im peripheren Blut mehr PD-1 exprimieren. Da auch tumor-spezifische T-Zellen im peripheren Blut weniger PD-1 exprimierten als tumor-spezifische TIL, legen diese Daten nahe, dass die Expressionszunahme von PD-1 durch das Microenvironment induziert wird. Die Untersuchung der Funktionalität zeigte, dass auch ein TCR-unabhängiger, starker Stimulus (PMA/Ionomycin) in den tumor-spezifischen, PD-1 positiven TIL keine vergleichbare Zytokin-Produktion wie in PD-1 negativen TIL mehr auslösen konnte: die Effektorfunktion war zu stark via PD-1 gehemmt. [86]

1.5.6. Lokalisation von PD-1

Bennett et al. setzten in Experimenten sogenannte Beads ein, d.h. protein-beladbare Mikrosphären aus Eisenpartikeln, um die Lokalisation von PD-1 und dem T-Zell-Rezeptor und eine eventuelle Abhängigkeit von einander zu untersuchen. Die Ergebnisse legten nahe, dass PD-1 sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum Antigenrezeptor befinden muss, um seine inhibitorische Wirkung zu entfalten: Nur Beads, die sowohl einen TCR-Stimulus (anti-CD3 Antikörper) als auch den Liganden für PD-1 gleichzeitig auf der Oberfläche trugen (CIS-Konfiguration), führten zu reduzierter T-Zell-Aktivierung. Waren PD-L1 und anti-CD3 hingegen auf getrennten Beads (TRANS-Konfiguration) gebunden, fand keine Inhibition statt. [11] (Abbildung 1.5)

Auch Untersuchungen von Chemnitz et al., die die Rekrutierung von SHP-1 und SHP-2 zu PD-1 untersuchten, legten nahe, dass das PD-1-Signal in direkter Nähe zu CD3 oder CD28 initiiert werden muss, da andernfalls keine Hemmung der T-Zell-Antwort

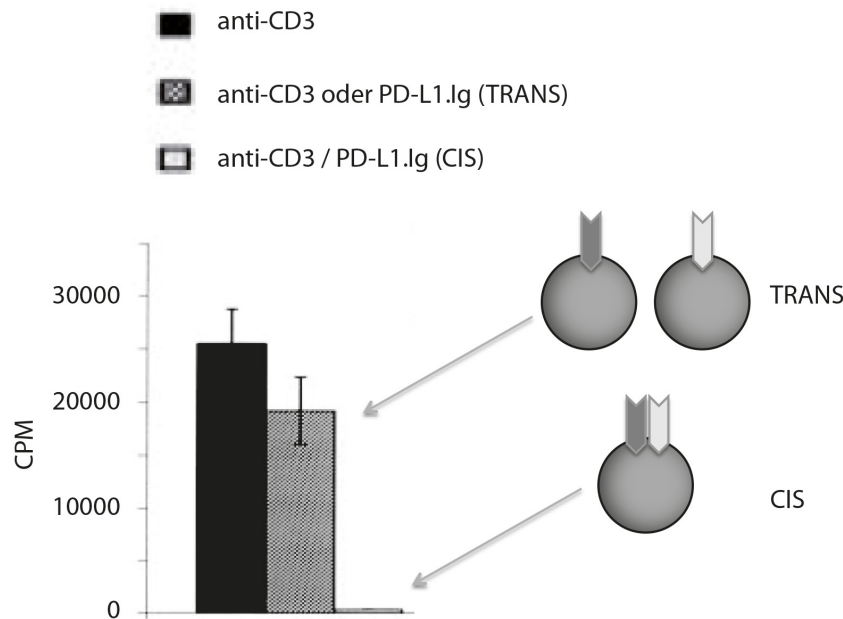


Abbildung 1.5.: PD-1/TCR-Kolokalisation als Voraussetzung für PD-L1-vermittelte Inhibition: Da ausschließlich simultane Präsentation von PD-1- und TCR-Stimuli auf gemeinsamem Bead zur T-Zell-Hemmung führten, während separate Präsentation auf getrennten Beads diesen Effekt nicht zeigte, postulierte Bennett et al. die Kolokalisation von TCR und PD-1 als Voraussetzung für eine PD-L1-vermittelte T-Zell-Hemmung. (nach: Bennett et al, 2003 [11])

stattfindet. [32]

Untersuchungen der intra- und extrazellulären Lokalisierung von PD-1 in der Arbeitsgruppe von James Allison zeigten, dass PD-1 in CD4⁺ T-Zellen sowohl an der Plasmamembran, in der Nähe des Golgi-Apparates und am Trans-Golgi-Netzwerk zu finden ist. Gehen die CD4⁺ T-Zellen dann physischen Kontakt mit einer dendritischen Zelle ein, zeigt sich initial eine Akkumulation von PD-1 an der Synapse, ähnlich wie CD28, allerdings verteilt sich im Zeitverlauf PD-1 dann wieder diffuser auf der Zelloberfläche. Die Konzentrierung von PD-1 an der Zellkontaktstelle war dabei abhängig von der Präsenz von PD-L1 und PD-L2, wobei PD-L2 die größere Affinität besitzt und zu einer verstärkten Akkumulation führt. [127]

1.6. Fragestellung dieser Promotion

In Zusammenschau der bisherigen Forschungsergebnisse und Datenlage ist also festzuhalten, dass eine Interaktion von PD-L1 und PD-1 eine Rolle im Immunescape Mechanismus von Tumoren spielt. Dies wird unterstrichen durch die Expressionsmuster von

PD-1 auf tumor-infiltrierenden Lymphozyten und PD-L1 auf einer Breite an Tumorarten. Die Lokalisationsanalysen mit Bead-Zell-Konjugaten von Bennett et al. legen dabei eine Ortsabhängigkeit bzw. eine Kolo-kalisation von PD-1 und dem T-Zell-Rezeptor nahe. Unter der Annahme, dass eine Modifikation des PD-L1/PD-1-Signals einen Ansatzpunkt für eine mögliche Tumorthherapie darstellt, soll im Mausmodell der Einfluss von PD-1 auf die T-Zell-Funktionalität durch genetische Variationen (Knockoutsetting, Wildtyp, Überexpression) verglichen werden. Unklar ist auch bislang, welche Rolle die Lokalisation von PD-1 während der Interaktion zwischen T-Lymphozyt und Tumorzelle spielt und ob das Phänomen, das bei Bead-Zell-Analysen beobachtet wurde, auch hier nachvollzogen werden kann. Diesbezüglich soll auch untersucht werden, ob die beschriebene Kolo-kalisation von PD-1 mit dem TCR auch eine Veränderung der Oberflächen-Expression bedingt, also ob und wenn ja, wann im Laufe der T-Zell-Aktivierung PD-1 divers oder eher akkumuliert exprimiert wird. Da die T-Zell-Effektorfunktionalität abhängt von der adäquaten Modifikation des Zellskeletts und der Ausbildung der Synapse, also des „Kiss of Death“, stellt sich hier die Frage, ob die Inhibition durch PD-1 möglicherweise einer insuffizienten Ausbildung eben dieses „Kiss of Death“ zu Grunde liegt. Und schließlich ist natürlich von Interesse, ob – wenn PD-1 aller Wahrscheinlichkeit nach kolo-kalisiert mit dem TCR und somit eine aktive Bewegung stattfindet – auch der Tumor eine Veränderung seiner PD-L1 Expression bzw. des Expressionsmusters im Sinne eines „Counterattack“ herbeiführt, um den Immunescape zu optimieren. Zusammengefasst ist somit das Ziel dieser Promotionsarbeit die Analyse der Lokalisation von PD-1 auf T-Lymphozyten während der Interaktion mit Tumorzellen und der dadurch bedingte Einfluss auf die T-Zell-Funktionalität.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Tumorzelllinien

Tabelle 2.1.: Tumorzelllinien

Tumor	Tumorart	Maus Background	Literatur/Anmerkung
p815	Mastozytom	H-2d DBA/2	ATCC
p815.B7-1	Mastozytom	H-2d DBA/2	Gajewski et al. [58] mit B71 transfiziert
HTR.c	Mastozytom	H-2d DAB/2	Gajewski et al. [58] Subklon von p815, bildet solide Tumoren <i>in vivo</i>
MC57-SIY	Fibrosarkom	H-2b C57BL/6J	Spiotto et al. [151] transfiziert mit SIYRYGGL
EL4	T-Zell-Lymphom	H-2b C57BL/6N	ATCC chemisch induziert
B16.SIY	Melanom	H-2b C57BL/6J	Blank, Brown et al.[15] transduziert mit dem Peptid SIYRYGGL-eGFP
B16.SIY E12	Melanom	H-2b C57BL/6J	transduziert mit dem Peptid SIYRYGGL ohne GFP zur Verfügung gestellt von Lisa Borkner

2.1.2. Mäusstämme

Experimente mit murinen Zellen wurden an der Universität Regensburg und am NKI (Nederlands Kanker Instituut) in Amsterdam durchgeführt. Die Tiere wurden in IVC (individually ventilated cages)-Käfigen, gemäß den Richtlinien des Deutschen bzw. Niederländischen Tierschutzgesetzes gehalten. In Regensburg wurde dem Trinkwasser stan-

dardmäßig konzentrierte Salzsäure HCl (1ml/l Wasser) zugesetzt. Zur Vermeidung nosokomialer Infektionen wurde zusätzlich Cotrim K (144mg Cotrimoxazol (Kombination aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol)/250ml Wasser) zugegeben.

Tabelle 2.2.: Mausstämme

Maus	Haltung	Erstbeschreibung	Herkunft
C57BL/6	Kauf	-	Janvier, Le Genest-St-Isle, Frankreich
C57BL/6 PD1tg	Zucht, IVC	Keir et al. [87]	zur Verfügung gestellt durch A. Sharpe, Eigenzucht
2C TCRtg RAG2-/-	Zucht, IVC	Kranz et al. [96]; Chen et al. [33]	Zur Verfügung gestellt durch T. Gajewski; Eigenzucht
2C TCRtg RAG2-/- PD1-/-	Zucht, IVC	Nishimura et al. [115]	Zur Verfügung gestellt durch T. Honjo; Eigenzucht
2C TCRtg RAG2-/- PD1tg	Zucht, IVC	-	Eigenzucht
C57BL/6 PD-L1-/-	IVC	-	Zur Verfügung gestellt durch Universität Würzburg

2C TCRtg RAG2-/- Die beiden Gene RAG-1 und RAG-2 (Recombinase Activation Gene) werden zur Rekombination der T- und B-Zell-Rezeptoren benötigt. Bei einem Defekt in einem der beiden Gene werden keine funktionellen Rezeptoren gebildet und es entstehen keine reifen T- oder B-Zellen. RAG1-/- und RAG2-/- Mäuse sind daher von Geburt an lymphopen [108, 148].

2C TCRtg RAG2-/- Mäuse tragen zusätzlich zur RAG-Defizienz die Information für einen transgenen TCR, was zur Ausreifung einer monoklonalen T-Zell-Population führt. Dieser transgene CD8⁺ T-Zellklon ist spezifisch sowohl für das artifizielle SIY-Peptid (SIYRYGGL), welches auf dem syngenem MHC-I-Komplex H-2Kb präsentiert wird, als auch für das ubiquitär vorkommende p2Ca-Peptid (LSPFPFDL) der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase im allogenen MHC-I-Komplex H-2Ld [96, 144]. Auch in diesem Mausstamm werden aufgrund des genetischen Defektes im RAG2-Gen alle T- und B-Zellen während der Thymusreifung depletiert, mit Ausnahme der T-Zellen, die den transgenen Rezeptor exprimieren. Da

die eingefügte genetische Information für den T-Zell-Rezeptor CD8-restringiert ist, liegen in der Peripherie daher ausschließlich 2C TCRtg CD8⁺ T-Zellen vor.

2C TCRtg RAG2^{-/-} PD1^{-/-} 2C TCRtg RAG2^{-/-} wurden mit PD1^{-/-} Mäusen gekreuzt. Die PD-1-Defizienz ist bedingt durch eine Veränderung im PD-1 kodierenden Gen PDCD1, das zu einem Defekt in der Transmembrandomäne von PD-1 führt. Dadurch wird zwar PD-1 transduziert, aber nicht auf der Zelloberfläche präsentiert. Intrazellulär ist aber immer noch die extrazelluläre Domäne vorhanden und nachweisbar.

2C TCRtg RAG2^{-/-} PD1tg Ebenso wurden 2C TCRtg RAG2^{-/-} Mäuse mit BL/6 PD1tg Mäusen gekreuzt. Die so entstandenen Mäuse haben ausschließlich T-Zellen mit dem 2C TCR und zeigen bereits im naiven T-Zell-Stadium eine konstitutive Überexpression von PD-1.

2.1.3. Antikörper

Tabelle 2.3.: FACS Antikörper

	Isotyp	Klon	Herkunft	Fluorochrom	Hersteller	Verd.
anti-CD3	rIgG ₁ , κ	145-2C11	Ratte	F, APC	BD Pharmingen	1:80
anti-CD4	rIgG _{2a} , κ	RM4-5	Ratte	F, PE, APC	BD Pharmingen	1:80
anti-CD8	rIgG _{2a} , κ	53-6.7	Ratte	F, PE, APC	BD Pharmingen	1:80
anti-CD28	hIgG	37.51	Hamster	PE	ebioscience	
anti-CD44	rIgG _{2a} , κ	IM7	Ratte	PE	BD Pharmingen	1:80
anti-CD62L	rIgG _{2a} , κ	Mel-14	Ratte	PE	BD Pharmingen	1:80
anti-CD80			Hamster	PE		1:80
anti-CD86			Ratte	PE		1:80
anti-CD107a	rIgG _{2a} , κ	1D4B	Ratte	F	BD Pharmingen	1:200
anti-PD1	hIgG	J43	Hamster	PE	ebioscience	1:50
anti-PD-L1	rIgG _{2a} , κ	MIH5	Ratte	PE	ebioscience	1:80
anti-H-2Kb				Biotin		1:50
anti-H-2Ld			Maus	purified		1:1
anti-mouse Ig			Ziege	PE	Southern Biotech	1:20
anti-mouse Ig			Ziege	F	BD Pharmingen	1:50
Isotyp	rIgG _{2a} , κ	R35-95	Ratte	F, PE, APC	BD Pharmingen	
anti-1B2	-	-	Maus	F, AF647	Kranz et al.[96]	1:50
2.4G2	-	-	-	-	ATCC	-
Streptavidin	-	-	-	PE	BD Pharmingen	1:50

Tabelle 2.4.: Antikörper und Standards für ELISA

BD Pharmingen		Herkunft	Klon	Konz.
Capture	anti-Maus IL-2	Ratte	JES6-1A12	1 μ g/ml
Detektion	anti-Maus IL2-bio	Ratte	JES6-5H4	0,1 μ g/ml
Standard	rMu IL2			0,02 μ g/ml
Capture	anti-Maus IFN	Ratte	R4-6A2	1 μ g/ml
Detektion	anti-Maus IFN-bio	Ratte	XMG1.2	0,1 μ g/ml
Standard	rMu IFN			0,1 μ g/ml

Tabelle 2.5.: Antikörper für Immunfluoreszenz

	Isotyp	Klon	Herkunft	Fluorochrom	Hersteller	Verd.
anti-CD3	rIgG ₁ , κ	145-2C11	Ratte	FITC	BD Pharmingen	1:30
anti-CD8	rIgG _{2a} , κ	53-6.7	Ratte	FITC	BD Pharmingen	1:50
anti-PD1	hIgG	J43	Hamster	purified, Biotin	ebioscience	1:30
anti-PD-L1	rIgG _{2a} , κ	MIH5	Ratte	purified	ebioscience	1:30
anti-1B2	-	-	Maus	F, purified	Kranz et al.[96]	1:50
anti-Granzyme B			Hase	purified	abcam	1:100
anti-Perforin			Ratte	purified	abcam	1:100
anti-Tubulin		DM1A	Maus	purified	NeoMarkers	1:100
anti-hamster IgG			Ziege	Biotin	ebioscience	1:30
anti-mouse Ig			Ziege	FITC	Southern Biotech	1:100
anti-rabbit IgG			Ziege	Alexa 488		1:100
anti-rat IgG		G28-5	Ziege	FITC	BD Pharmingen	1:100
Isotyp	rIgG _{2a} , κ	R35-95	Ratte	purified	BD Pharmingen	
Isotyp	hIgG		Hamster	purified	ebioscience	
Isotyp	mIgG ₁ , κ		Maus	purified		
Isotyp	mIgG _{2a} , κ		Maus	Biotin	BD Pharmingen	
Isotyp	rIgG _{2a} , κ		Ratte	Biotin	ebioscience	
Streptavidin	-	-	-	Cy5	Caltag	1:50
Streptavidin	-	-	-	FITC	BD Pharmingen	1:50

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur / Technik

Alle Arbeiten mit murinen Tumorzelllinien und Primärkulturen sowie alle funktionellen Analysen wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt (LaminaAir HB2448, Heraeus).

Die Inkubation von Tumorzelllinien, Primärkulturen und funktionellen Analysen erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus 6000) bei einer Luftfeuchtigkeit von 95%, einem CO₂-Gehalt von 7,5% sowie bei einer konstanten Temperatur von 37°C.

2.2.1.1. Zentrifugation

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Zentrifugationsschritte sowohl für Tumorzellen als auch für murine Primärzellen bei 4°C für fünf Minuten bei 330×g durchgeführt.

2.2.1.2. Ermittlung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung

Zellsuspensionen wurden 1:1 mit einer Trypanblaulösung (Trypan Blue Stain 0,4%, Gibco, Invitrogen) verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe eines Mikroskops (Leitz DMRB, Leica) ausgezählt. Der Farbstoff Trypanblau wird ausschließlich von Zellen mit fehlender Membranintegrität aufgenommen. Daher erscheinen tote Zellen blau, lebende Zellen hingegen ungefärbt. Berechnet wird die Zellzahl nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Anzahl lebender Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,01}{\text{Anzahl der Großquadrate}} = \text{Zellzahl} \times 10^6 / \text{ml} \quad (2.1)$$

2.2.2. Zellkultur

2.2.2.1. Splitten adhärenter und nicht-adhärent wachsender Tumorzelllinien

Alle Tumorzelllinien wurden ca. zweimal pro Woche bei einer Konfluenz von etwa 90% abgeerntet. Dazu wurde zunächst das Medium der adhärent wachsenden Kulturen abgenommen und der Zellrasen wurde einmal mit PBS gespült. Das Ablösen der Tumorzellen erfolgte durch eine ca. dreiminütige Inkubation bei RT mit 3ml 1× = 10% Trypsin/EDTA (10fach, PAN Biotech) in PBS. Die Suspension aus abgelösten Zellen wurde mit 10ml Medium verdünnt und abzentrifugiert. Eine neue Zellkulturflasche wurde schließlich – je nach Bedarf und Zelllinie – mit 1/5 bis 1/20 der abgeernteten Zellen angeimpft.

Nicht-adhärenz wachsende Kulturen wurden zweimal pro Woche abzentrifugiert und mit Medium gewaschen. Die neue Kultur wurde ebenfalls – je nach Bedarf und Zelllinie – mit 1/5 bis 1/20 der abgeernteten Zellen angeimpft.

2.2.2.2. Mycoplasmentest

In Regensburg erfolgte in regelmäßigen Abständen die Überprüfung der verwendeten Tumorzelllinien auf Mycoplasmen mit Hilfe des VenorGEM-Tests (Minerva Biolabs). In Amsterdam wurden die Zellkulturen mittels des MTC-NI-Schnellnachweissystems (Mycoplasma Tissue Culture NI, Gen-Probe) getestet.

2.2.2.3. Auftauen und Einfrieren von Zelllinien

Zellaliquots ($1-5 \times 10^6$), die in flüssigem Stickstoff eingefroren waren, wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und unverzüglich in 10ml Medium überführt. Nach Zentrifugation und einem Waschschrift mit Medium wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche mit Medium überführt. Aliquots neu aufgetauter Tumorzellen wurden nach zwei bis drei Passagen erneut eingefroren. Dazu wurden nach dem Abernten Zellaliquots mit $1-5 \times 10^6$ Zellen in 1ml Einfriermedium zunächst bei -80°C eingefroren und nach zwei Tagen zur längeren Lagerung in flüssigem Stickstoff eingelagert.

2.2.3. Isolierung muriner Zellen

2.2.3.1. Splenektomie aus Mäusen

Um T-Zellen aus Mäusen zu isolieren, wurden die Tiere zuerst mittels CO_2 -Narkose getötet und in eine sterile Werkbank transferiert. Dort wurden die Tiere mit 70% Ethanol gewaschen. Mit einem ersten Set, bestehend aus Pinzette und Schere, wurde die Haut samt Fell in Höhe des linken Rippenbogens angehoben und aufgeschnitten. Das darunter liegende Bauchfell wurde mit einem zweiten, mit Ethanol gereinigten Set eröffnet und die Milz entnommen. Diese wurde in ein mit gekühltem Medium gefülltes 15ml Röhrchen überführt.

2.2.3.2. Gewinnung naiver T-Zellen aus Milzen

Für die Isolierung von T-Zellen aus Milz und Lymphknoten wurden die entnommenen Organe zunächst steril über ein Zellsieb (Cell Strainer $100\mu\text{m}$, BD Falcon) in einer Petrischale (Easy Grip Petri Dish, Falcon) zerrieben, um eine Einzelzellsuspension

herzustellen. Alternativ wurde das Zellsieb direkt auf ein 50ml-Röhrchen (BD Falcon) aufgesetzt, so dass die Zellsuspension direkt in den Behälter tropfte. Die Suspension wurde erneut über ein Zellsieb pipettiert, um Gewebeteile zu entfernen. Nach einem Waschschrift wurden die Splenozyten in dem jeweils benötigten Puffer zur Zellaufreinigung oder Stimulation aufgenommen. Sowohl naive polyklonale als auch monoklonale T-Zellen wurden mit Hilfe der negativen Zellseparation isoliert. Im Rahmen dieser Arbeit kamen zwei verschiedene Separationssysteme zur negativen Zellisolierung zum Einsatz, das Dynal-System und das SpinSep-System.

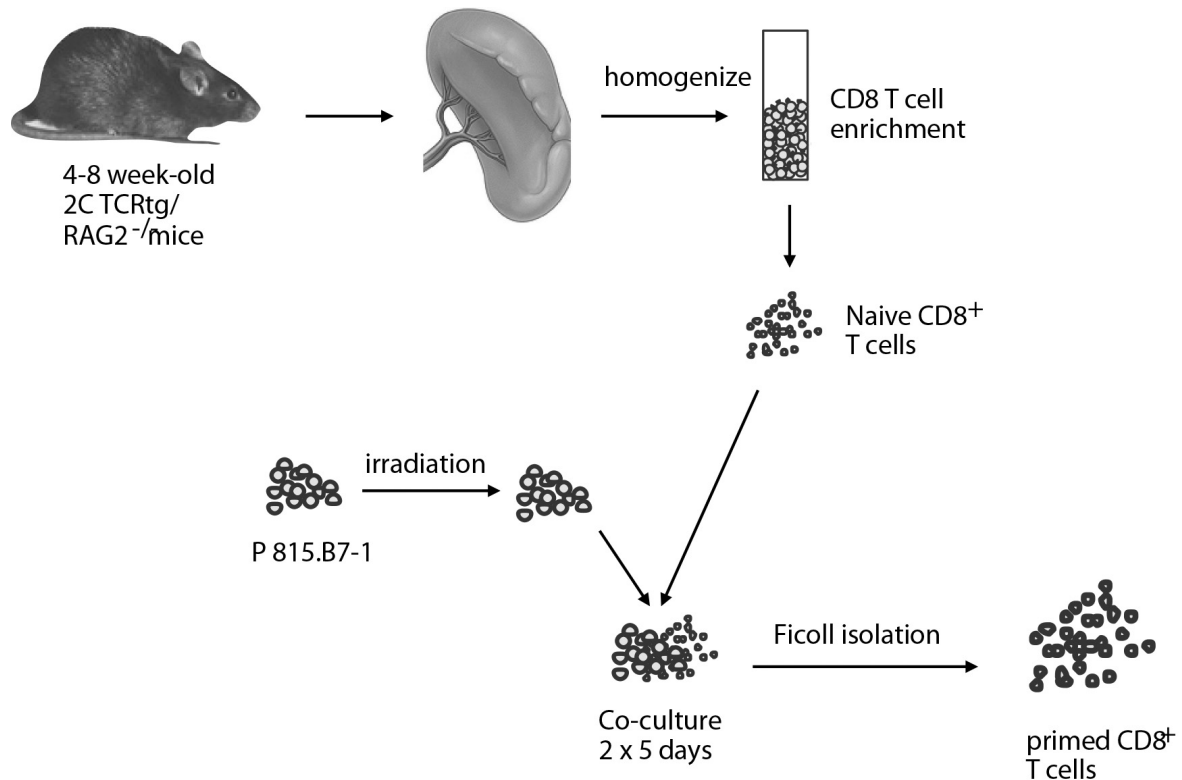


Abbildung 2.1.: Gewinnung und Aufbereitung von murinen T-Zellen: Nach Tötung durch CO₂-Narkose und Entnahme der Milz wurden T-Zellen mit Hilfe von Isolierungskits gewonnen, aufgereinigt, die CD8⁺ Konzentration durchflusszytometrisch bestimmt und anschließend durch Kokultivierung mit bestrahlten Zieltumorzellen zur Proliferation gebracht.

2.2.3.3. Dynal-Kit: Magnetische Zellseparation

Die Separationsmethode von Dynal (Dynal Mouse CD8⁺ Negative Isolation Kit, Invitrogen Dynal) beruht auf der Kopplung magnetischer Polystyrol-Beads mit Zellen. Ein Cocktail aus verschiedenen Ratte-Antikörpern markiert zunächst alle Zellen, die entfernt werden sollen. Die Beads, die mit polyklonalen sheep-anti-rat IgG Antikörpern beschich-

tet sind, binden anschließend an die zu entfernenden Zellen, während die zu isolierenden Zellen unmarkiert und ungebunden bleiben (Prinzip der negativen Zell-Isolierung). Zunächst wurden die Splenozyten abzentrifugiert und in 1ml PBS + 10% BSA (Albumin Fraktion V, Roth) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit dem Cocktail von Ratte-Antikörpern (150 μ l/Milz) sowie 200 μ l FCS/Milz zum Abblocken unspezifischer Bindungen versetzt und bei 4°C inkubiert. Nach 20 Minuten wurden nicht gebundene Antikörper durch Waschen der Zellsuspension mit PBS + 0,1% BSA entfernt, und das Pellet wurde in 5ml PBS + 0,1% BSA/Milz resuspendiert. Die magnetischen Beads wurden zweimal mit PBS + 0,1% BSA gewaschen und anschließend zur Zellsuspension gegeben (1,5ml beads/Milz). Nach einer Inkubation von 15 Minuten auf dem Überkoprotator (MACSmix, Miltenyi Biotec) wurde die Suspension in einen Handmagneten überführt. Durch das magnetische Feld werden Zellen, die an die magnetischen Beads gebunden sind, an der Röhrchenwand festgehalten, so dass sich nur noch die unmarkierten, erwünschten Zellen in Suspension befinden. Diese Suspension wurde in ein neues Röhrchen überführt und erneut für 2 Minuten im Magneten inkubiert, um auch noch letzte markierte Zellen zu entfernen. Schließlich wurden die isolierten T-Zellen zentrifugiert, in Medium resuspendiert, ausgezählt und für die FACS-Analyse der Aufreinigung vorbereitet.

2.2.3.4. SpinSep-Kit: Zellseparation über die Dichte

Das System zur Zellseparation von SpinSep (SpinSep Negative Isolation Kit für CD8⁺ T-Zellen (CellSystems) trennt markierte und nicht markierte T-Zellen aufgrund unterschiedlicher Dichte. Um diese unterschiedlichen Dichten zu erreichen, wurden auch in diesem System zunächst alle unerwünschten Zellen mit einem Antikörpercocktail (15 μ l/Milz, resuspendiert in 2ml SpinSep Puffer/Milz) markiert. Nach 15 Minuten Inkubation bei 4°C und dem Entfernen überschüssiger Antikörper durch Waschen mit dem SpinSep Puffer erfolgte die Zugabe der sogenannten SpinSep Dense Particles (500 μ l/Milz, resuspendiert in 2ml SpinSep Puffer/Milz). Diese sind mit Antikörpern gegen den Fc-Teil des Antikörpercocktails beschichtet und binden daher an alle zu depletierenden Zellen. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Auftrennung der markierten („schweren“) und der nicht-markierten („leichten“) Zellen in einem speziellen Dichtegradienten. Dazu wurden 5 ml des sogenannten SpinSep Density Mediums in einem 15 ml Röhrchen (Corning Costar) vorgelegt und mit der Suspension aus Zellen und Partikeln vorsichtig überschichtet, so dass zwei getrennte Phasen entstanden. Alle „schweren“ Zellen finden sich nach Zentrifugation (10 min, 770 \times g, ohne Bremse) im Pellet wieder, während sich

die unmarkierten Zellen in der Interphase zwischen Density Medium und überschichtetem Zellkulturmedium ansammeln. Diese Phase wurde abgezogen und mit SpinSep Puffer gewaschen, um das restliche Density Medium zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen, ausgezählt und für die FACS-Analyse der Aufreinigung vorbereitet.

2.2.4. *In vitro* Stimulation naiver 2C TCR tg T-Zellen mit dem Tumor P815.B7-1 und Restimulation

2C TCRtg (2C PD1-/-, 2C PD1tg) T-Zellen können *in vitro* mit P815.B7-1 stimuliert werden. In einer 24-well-Platte (Tissue Culture Treated, Polystyrene, Corning Costar) wurden dazu 10^5 2C T-Zellen mit 5×10^5 Tumorzellen in 2,5 ml Medium koinkubiert. Um zu verhindern, dass die Tumorzellen die T-Zellen überwachsen, wurden jeweils 3×10^7 P815.B7-1 Tumorzellen in 10ml Medium mit Mitomycin C (2mg/ml Medium, Medac) für 90 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen insgesamt dreimal mit Medium gewaschen, wobei die Zellen nach dem zweiten Waschschrift für 10 Minuten im Medium ruhten, damit überschüssiges Mitomycin C ausgeschieden werden konnte. Alternativ zur Behandlung mit Mitomycin C wurden die Tumorzellen mit 100Gy bestrahlt.

Nach fünf Tagen wurden die Zellen abgeerntet, zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde vorsichtig auf Ficoll (Pancoll human, PAN Biotec) geschichtet, so dass zwei getrennte Phasen entstanden. Nach einer entsprechenden Zentrifugation (20min bei RT, $525 \times g$, ohne Bremse) befanden sich lebende T-Zellen in der Interphase, während sich tote Zellen und Tumorzellen im Pellet absetzten.

Die repetitive Stimulation der so isolierten T-Zellen erfolgte nach dem gleichen Schema der fünftägigen Kokultur im Verhältnis 1:5 T-Zellen zu Tumorzellen.

2.2.5. Analyse von Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

2.2.5.1. Prinzip des FACS

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden an einem FACS-Calibur (BD) mit dem Cellquest-Programm durchgeführt. Die Auswertung der aufgezeichneten FACS-Daten erfolgte mit Hilfe des Flowjo-Programms (Treestar, San Carlos, CA).

Die Messeinstellungen wurden vor jeder Messung mit ungefärbten Proben, Einzelfärbungen bzw. Isotypkontrollen überprüft und gegebenenfalls korrigiert. (Abbildung 2.2)

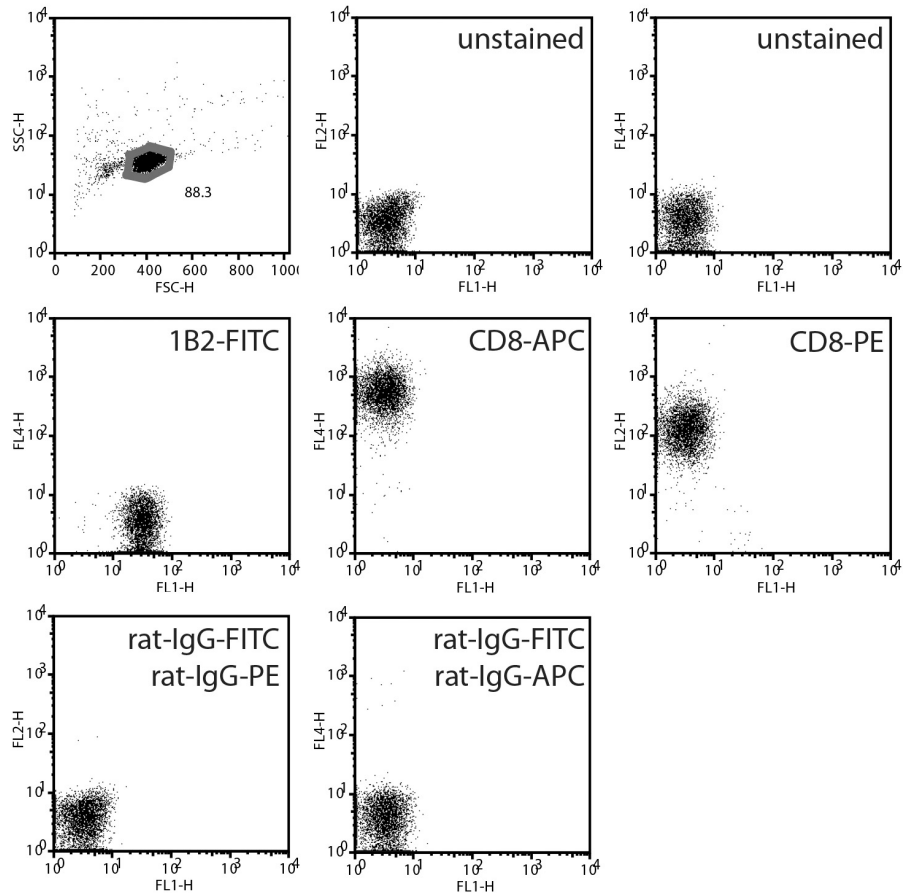


Abbildung 2.2.: Initiale Einstellung der FACS-Parameter bei jeder Messung, von links oben nach rechts unten: Gate auf T-Zellen anhand der Zellmorphologie („Sizegates“) und Laser-Einstellung durch ungefärbte Zellproben (unstained), Kontrolle durch einfach gefärbte Zell-Proben für jeden Farbkanal (FITC, APC, PE) sowie durch Negativ-Proben (rat-IgG).

Im FACS (fluorescence-activated cell sorter) können Zellen charakterisiert werden. Das Vorwärtsstreulicht (forward-scatter, FSC) liefert Informationen über die Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (side-scatter, SSC) dagegen gibt Auskunft über die Granularität der Zelle. Im FACS Calibur können zusätzlich zu diesen beiden Eigenschaften über fluoreszenzmarkierte Antikörper noch vier weitere Parameter untersucht werden. Dazu verfügt das FACS Calibur über zwei Laser (Argon- und UV-Laser), welche die Fluoreszenzfarbstoffe anregen können. Die Emission der Farbstoffe kann in vier Kanälen gemessen werden. Als Farbstoffkonjugate wurden FITC (Fluoroisothiocyanat), PE (Phycoerythrin), PercP (Peridin-Chlorophyll-Protein), APC (Allophycocyanin) und Alexa Fluor 647 eingesetzt.

2.2.5.2. Antikörperfärbung von Oberflächenmarkern auf murinen Zellen

Für FACS-Färbungen wurden 96-well Spitzbodenplatten (Mikrotiterplatten, V-Bottom, Greiner) verwendet. Je $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden pro well für eine Färbung eingesetzt.

Bevor die gegen Oberflächenmoleküle gerichteten Antikörper zugegeben wurden, wurden die Zellen zunächst einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden mit $15 \mu\text{l}$ 2.4G2 (anti-Fc-Rezeptor-Antikörper) abgesättigt. Anschließend wurden $10 \mu\text{l}$ eines direkt konjugierten Antikörpers zupipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 4°C im Dunkeln für 15 Minuten. Anschließend wurden überschüssige Antikörper mittels eines Waschschrattes mit FACS-Puffer entfernt. Die gefärbten Proben wurden schließlich für die Messung am FACS in kleine Röhrchen ($1,2 \text{ ml}$ Polypropylene Cluster Tubes, Costar Corning) überführt. Die Proben wurden innerhalb von zwei Stunden gemessen, ansonsten zur späteren Analyse mit 1%igem Formaldehyd in PBS fixiert und innerhalb von 12 Stunden ausgewertet.

Es wurden nicht mehr als zwei verschiedene Antikörper pro Färbung eingesetzt, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Ein Waschschratt ermöglicht die Färbung mit bis zu zwei weiteren Antikörpern.

Alternativ zur FACS-Färbung mit bereits fluorchrom-konjugierten Antikörpern besteht auch die Möglichkeit, eine indirekte Färbung durchzuführen, um z.B. schwache Signale zu verstärken. Dabei wird im ersten Schritt der unmarkierte oder biotinylierte Antikörper zur Probe gegeben. Nach Inkubation und Waschen mit FACS-Puffer folgt dann die eigentliche Färbung entweder mit einem sekundären Antikörper, welcher den unmarkierten primären Antikörper über die spezifische Struktur dessen Fc-Teils erkennen kann, oder mit Streptavidin, welches an ein Fluorchrom konjugiert ist und an den Biotin-Part des primären Antikörpers bindet.

2.2.5.3. Labeling von 1B2

Ein spezifischer Antikörper gegen den 2C TCR ist nicht käuflich zu erwerben. Dieser Antikörper wurde in unserem Labor aus dem Überstand des Hybridoms 1B2 mit Hilfe des ImmunoPure (G) Kit (Pierce) aufgereinigt.

Obwohl schwache Signale mittels einer indirekten Färbung mit einem nachfolgenden Sekundärantikörper verstärkt werden können, besteht die Gefahr einer unspezifischen Bindung des sekundären Antikörpers, was zu erhöhtem Signalrauschen führt. Deshalb wurde der Antikörper gegen den 2C TCR unter Verwendung des Alexa Fluor 647 Monoclonal Labeling Kits (Invitrogen, Methode siehe unten) direkt markiert.

2.2.5.4. Analyse der T-Zell-Aufreinigung

Jeder Aufreinigung von T-Zellen folgte eine abschließende FACS-Kontrolle. Analysiert wurde dabei die Menge an CD8⁺ Zellen und deren Aktivierungsstatus.

Abbildung 2.3 zeigt eine Standard-FACS-Analyse für naive 2C TCRtg T-Zellen. Dabei wurde zunächst ein Gate um die Lymphozytenpopulation gesetzt, um tote Zellen auszuschließen. Im nächsten Schritt erfolgte die Identifizierung der doppelt positiven anti-1B2-FITC- und anti-CD8-APC-positiven Zellen, um die Reinheit der aufgereinigten Zellen bzw. den Anteil dieser Population in der Gesamt-Splenozytenpopulation zu bestimmen.

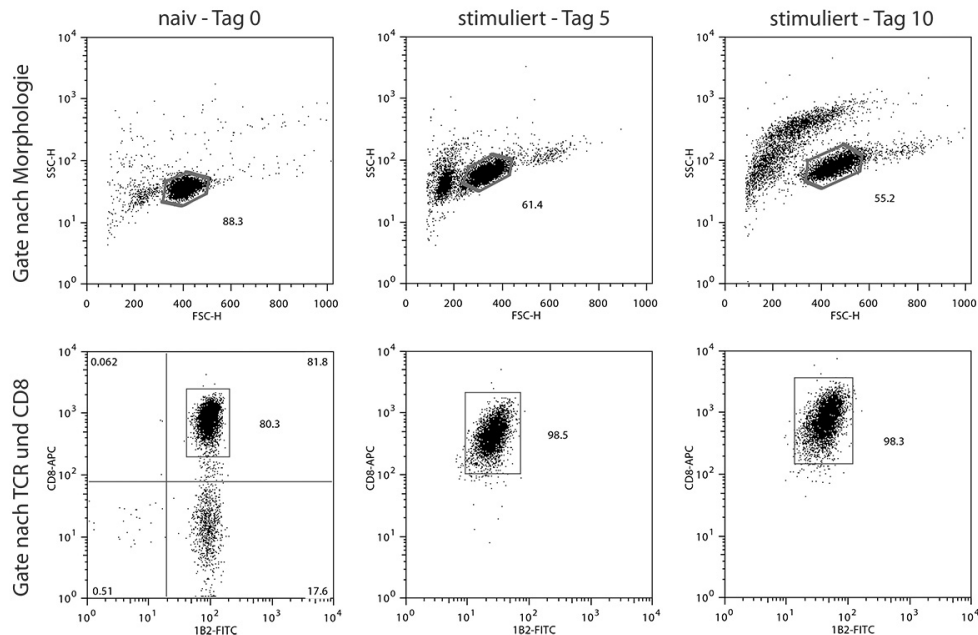


Abbildung 2.3.: Bestimmung des Anteils CD8⁺ TCRtg T-Zellen: Nach initialer T-Zell-Gewinnung aus Milzmaterial sowie nach jedem Proliferationsschritt erfolgte die Konzentrationsbestimmung der CD8⁺ TCRtg am Anteil der lebenden Lymphozyten (Morphologie/Sizegate) zur genauen Zellzahlanpassung in den Kokulturen.

Zudem wurden die 2C T-Zellen, bevor sie in einem Experiment eingesetzt wurden, routinemäßig auf ihren jeweiligen Aktivierungsstatus untersucht. Naive T-Zellen zeigen dabei eine niedrige CD44- und eine hohe CD62L-Expression.

2.2.6. Beads

Zum Einsatz kamen M-450 Epoxy-Beads (Dynabeads M-450 Epoxy, Invitrogen Dynal). Diese 4,5 μ m großen, magnetischen Polystyrol-Partikel sind hydrophob und mit Epoxid-

Gruppen bedeckt, die wiederum Amine, Thiole und Hydroxyl-Gruppen binden können. Dies erlaubt die Kopplung von Antikörpern an die Beads.

2.2.6.1. Coating von Beads mit Antikörpern

10^7 Beads wurden in 1ml Phosphat-Puffer gewaschen. Danach wurde das Gefäß in einen Dynal-Magneten gestellt und der Puffer abgezogen, so dass die gewaschenen Beads an der Gefäßwand zurückblieben. Diese wurden erneut mit 1ml Phosphat-Puffer und mit der gewünschten Menge an Antikörper oder Immunglobulin (z.B. $1\mu\text{g/ml}$) versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Rotator bei RT. Die gecoateten Beads wurden dreimal mit PBS + 0,1% BSA gewaschen. Sollten weitere Antikörper in einem zweiten, separaten Schritt gekoppelt werden, erfolgte eine zweite Inkubation in 1ml Phosphat-Puffer über Nacht. Zuletzt wurden die gecoateten und gewaschenen Beads in Medium aufgenommen und für die FACS-Analyse vorbereitet.

2.2.6.2. Stimulation von T-Zellen mit Beads für ELISA

Beads, die mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern alleine oder zusätzlich mit PD-L1 Ig oder Isotyp Ig gecoatet worden waren, wurden für die unspezifische Aktivierung von T-Zellen eingesetzt. Dazu wurden pro well einer 96-well-Platte (Flat Bottom, Tissue Culture Treated, Corning Costar) jeweils 5×10^4 voraktivierte T-Zellen mit 5×10^4 Beads in $200\mu\text{l}$ Medium für 18h kokultiviert. Die Stimulation wurde durch Einfrieren gestoppt. Die Zytokin-Konzentration im Überstand wurde mittels ELISA gemessen.

PD-L1 Ig ist eine Chimäre aus der Extrazellulär-Domäne von PD-L1 und dem Fc-Part eines Immunglobulins, kann also wie ein löslicher Antikörper verwendet und mit Beads gekoppelt werden. Als Isotyp-Kontrolle kam Sandoglobulin, ein humanes Immunglobulin, zum Einsatz, das dementsprechend keine signal-effektive Bindung mit PD-1 eingehen kann.

2.2.7. *in vitro* Assays

2.2.7.1. Target Tumoren

In den *in vitro* Assays, die durchgeführt wurden, um die Funktionalität von 2C TCRtg CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen, kamen folgende Tumoren in den Kokulturen zum Einsatz:

HTR.c ist ein Subklon der P815 Mastozytom-Zelllinie und exprimiert das Peptid p2CA auf allogenen H-2Ld, was 2C T-Zellen spezifisch erkennen. Daher wurde HTR.c in den Zytotoxizität-Assays als Positiv-Kontrolle verwendet.

EL4 ist eine T-Zell-Lymphom-Zelllinie auf syngenen H-2Kb Background, werden also von 2C T-Zellen nicht als „fremd“ erkannt und wurden daher als Negativ-Kontrolle eingesetzt.

B16.SIY E12 ist eine Melanom-Zelllinie. Nach Inkubation mit IFN γ über 48h exprimiert dieser Tumor PD-L1 sowie das artifizielle Peptid SIYRYGGL auf syngenen H-2Kb, welches 2C T-Zellen spezifisch erkennen.

2.2.7.2. Zytokinproduktion - ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

ELISA-Technik wurde genutzt, um die Zytokinproduktion von murinen T-Zellen zu analysieren. Um die Konzentration von Interleukin-2 (IL-2) oder Interferon- γ (IFN γ) in Zellüberständen zu messen, wurden dementsprechend unterschiedliche Antikörper-Paare in den Tests eingesetzt.

Zur Bestimmung der von T-Zellen produzierten Zytokinmenge wurde zunächst eine 96-well-Platte (Flat Bottom, Greiner) über Nacht bei 4°C mit dem Capture-Antikörper in Coating-Puffer beschichtet (50 μ /well). Am nächsten Tag wurde die Platte zweimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und für zwei Stunden mit PBS + 10% FCS abgesättigt. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Proben in der jeweils benötigten Verdünnung sowie der Standard mit der jeweiligen Startkonzentration aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Platten viermal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Danach wurden zunächst der biotinylierte Detektor-Antikörper aufgetragen, nach einstündiger Inkubation und fünf weiteren Waschschritten dann die Streptavidin-Peroxidase (1:3000 verdünnt, Dianova). Nach 30 Minuten Inkubation bei RT wurde die Platte erneut fünfmal gewaschen. Zur Entwicklung wurden pro well 100 μ l TMB-Substratlösung aufgetragen. Sobald sich eine Blaufärbung zeigte, wurde die Reaktion mit 2N Schwefelsäure (Merck) abgestoppt. Die Extinktion wurde anschließend im ELISA-Reader (precision microplate reader, MWG Biotech) bei 450nm gegen 650nm mit dem SOFTmax Programm gemessen und ausgewertet.

2.2.7.3. Proliferation – Tritium-Thymidine-Assay

Zur Bestimmung der proliferativen Kapazität von 2C TCRtg T-Zellen wurde ein ^3H -Thymidin Proliferationsassay durchgeführt. Dazu wurden 10^5 voraktivierte 2C T-Zellen mit 10^5 B16.SIY E12 Tumor-Zellen, die zuvor 48 Stunden mit $\text{IFN}\gamma$ (rMU $\text{IFN}\gamma$, 20ng/ml Medium) kokubiert worden waren, in 200 μl Medium für 18h kokultiviert. Anschließend wurde ^3H -Thymidin (1 μCi /well, Hartmann Analytic) zu den Ansätzen gegeben, das von proliferierenden Zellen in die DNA eingebaut wird. Die Inkorporation des radioaktiven Materials wurde nach sechs Stunden gestoppt, indem die Zellen mit destilliertem Wasser lysiert wurden. Die dabei freigesetzte DNA wurde auf Uni-Filter-Platten (1,2 μm Porengröße, Perkin Elmer Life Sciences) aufgefangen. Die getrocknete Filterplatte wurde mit 50 μl Szintillationsflüssigkeit pro well versetzt und in einem Szintillationszähler (Perkin Elmer Life Sciences) gemessen. Je mehr Radioaktivität ein Ansatz besitzt, desto mehr ^3H -Thymidin wurde eingebaut und desto höher war die Proliferationsrate.

2.2.7.4. Zytotoxizität – LAMP-Test

LAMP-1 (= CD107a = Lysosomen-assoziiertes Membranprotein 1) ist in der Membran der zytotoxischen Granula enthalten. Um deren Inhalt zu sezernieren, verschmelzen Zell- und Lysosomen-Membran, wodurch LAMP-1 auf der Zelloberfläche präsentiert wird, wo es wiederum mit einem Antikörper nachgewiesen werden kann. LAMP-1-Expression ist also ein Indikator für die zytotoxische Aktivität dieser Zelle.

Voraktivierte 2C T-Zellen und Tumorzellen wurden im Verhältnis 1:1 in 200 μl Medium in 96-well-Platten pipettiert. Anschließend wurden 2 μl /well anti-LAMP-PE zugegeben und die Platten nach Zentrifugation (60 \times g, 1min) für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze zusätzlich mit 1B2-FITC und anti-CD8-APC gefärbt. Die Proben wurden sofort im Anschluss durch FACS-Analyse untersucht.

2.2.7.5. Zytotoxizität – Chrome-Release-Assay

Die Fähigkeit von T-Zellen, *in vitro* spezifische Tumorzellen zu lysieren, wurde mit Hilfe eines ^{51}Cr -Release-Assays bestimmt. Die Tumorzellen wurden zunächst mit dem radioaktiven Chrom-Isotop ^{51}Cr markiert (100 μCi , 60 Minuten, 37°C), dreimal mit Medium gewaschen und in einer 96-well-Rundbodenplatte mit 5×10^3 Zellen/well ausplattiert. Die T-Zellen wurden im angegebenen Verhältnis von T-Zellen:Tumorzellen zugegeben. Nach einer Zentrifugation (1000 rpm, 1min) wurden die Ansätze für 4h bei 37°C inku-

biert. Im Anschluss daran wurden 50 μ l des Überstandes jeden wells auf eine Messplatte (Lumaplate 96, Packard) pipettiert und die Counts Per Minute (cpm) mit einem Szintillationszähler (Perkin Elmer Life Sciences) gemessen.

Der Prozentsatz der spezifischen Lyse (x) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{cpm}(x) - \text{cpm}(\text{min})}{\text{cpm}(\text{max}) - \text{cpm}(\text{min})} \times 100 = \% \text{ spezifische Lyse} \quad (2.2)$$

Die maximale ^{51}Cr -Freisetzung bzw. Lyse [cpm(max)] wurde durch Zugabe von Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in H_2O erreicht. Für die spontane ^{51}Cr -Freisetzung [cpm(min)] wurden Tumorzellen ohne T-Zellen inkubiert.

2.2.8. Immunfluoreszenz

Tabelle 2.6.: Fluorochrome

Name	Exzitation	Emission	Filter	Eignung
Alexa 488	492	520	488	+
Alexa 546	557	572	561 / 568	+
Alexa 568	577	603	561 / 568	+/-
Alexa 647	650	668	633 / 647	+
APC	651	661	633 / 647	+
Cy5	649	666	633 / 647	+
FITC	494	520	488	+
R-Phycoerythrin	567	576	448 / 568	+
TRITC	550	573	561 / 568	+

2.2.8.1. Labeling von Antikörpern mit Alexa Fluor

Um eine breitere Auswahl an Fluorochromen zu erhalten und die Nachteile von sekundären Antikörper-Färbungen, wie erhöhtes Signalrauschen durch unspezifische Bindungen, zu vermeiden, kamen Labeling-Kits (Alexa Fluor Monoclonal Antibody Labeling Kits, Invitrogen) zum Einsatz, die die direkte Kopplung von diversen stabilen Alexa Fluor-Fluorochromen mit Antikörpern ermöglichen. Die Kits enthalten neben dem eigentlichen Farbstoff und außer dem Zielprotein die benötigten Chemikalien und Filtersäulen.

Zuerst wurden 100 μ l Antikörper, idealerweise mit einer Konzentration von 1mg/ml, mit

10 μ l NaHCO₃-Puffer versetzt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit dem Alexa-Farbstoff gemischt. Die 60 minütige Inkubation erfolgte bei RT, alle 10–15min wurde das Gefäß bewegt. Währenddessen wurden 1,5ml der Harzlösung (Purification Resin) in die Aufreinigungssäule gegeben und bei 1500 rpm (rounds per minute, Umdrehungen pro Minute) für 3min zentrifugiert. Nach der Antikörperkopplung wurde die Farbstoff-Lösung auf das Harz der Säule gegeben und bei 1500 rpm für 3min zentrifugiert. Die aufgefangene Lösung entsprach dem mit Alexa-Farbstoff gelabelten Antikörper.

2.2.8.2. Objektträger

Glasobjektträger (76x26mm, Mattrand, Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH) wurden mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die gereinigten Objektträger wurden in 10% Poly-D-Lysin-Lösung (P7280, Sigma-Aldrich) für 5min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur mindestens 4 h getrocknet. Es wurden mit einem „Fettstift“ (Dako Pen, Dako) wasserabweisende Grenzen für zwei bis drei 1 \times 1cm große Felder (ca. 1cm²) aufgezeichnet, in die zunächst Poly-L-Lysin (P8920, Sigma-Aldrich) für 2h bei 37°C aufgetragen wurde. Nach einem PBS-Waschschritt wurden die Felder mit Laminin (L2020, Sigma-Aldrich) für mindestens 6 Stunden bei 4°C beschichtet.

Alternativ wurden kommerzielle Objektträger mit Kammern verwendet (Chamber slides, Labtek).

2.2.8.3. Immunfluoreszenz-Färbung

Pro Feld wurden 100 μ l einer Zellsuspensionen mit 2–5 $\times 10^6$ Zellen/ml auf einen Objektträger pipettiert. Nach 30–60min Ruhezeit hatten sich die Zellen auf den Boden des Objektträgers abgesetzt, so dass der Medium-Überstand vorsichtig abgenommen werden konnte. Nach einem Waschschritt mit PBS folgte, entsprechend der FACS-Färbung, die Absättigung freier Fc-Rezeptoren mit 15 μ l 2.4G2.

Für Kokulturen aus T-Zellen und Tumorzellen wurden zuerst 5 $\times 10^5$ T-Zellen mit 3 $\times 10^4$ Tumorzellen in 100 μ l Medium in einem Eppendorf-Cup kurz zentrifugiert, um Zellkontakt zu provozieren. Das Zellpellet wurde durch Erschütterung wieder gelöst und die Zellmischung auf die entsprechenden Felder pipettiert. Nach der Kokultivierung im Inkubator für 0,5–3h wurde der Medium-Überstand vorsichtig abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2.4G2 geblockt.

Für Färbungen von Oberflächenstrukturen wie PD-1, bei denen eine intrazelluläre Markierung vermieden werden sollte, musste die Zugabe von Antikörpern vor der Fixierung

der Zellen erfolgen, da zwar die Zugabe von Paraformaldehyd (PFA) die Zellen auf dem PLL-/Laminin-beschichteten Objektträger fixiert, aber gleichzeitig die Membranintegrität der Zellen aufhebt und somit nachfolgenden Antikörpern Zutritt zum Intrazellularraum ermöglicht. Daher wurde nach der Fc-Blockade und einem weiteren Waschschriff 15 μ l Antikörper-Lösung zugegeben und bei 4°C in Dunkelheit für 30min inkubiert. Es wurden maximal zwei Antikörper gleichzeitig zugefügt.

Anschließend wurden die Zellen erneut vorsichtig mit PBS gewaschen und schließlich mit 4% PFA für 30min fixiert. Durch die Perforierung der Zellmembran mittels PFA konnten nun intrazelluläre Strukturen wie Tubulin gefärbt werden. Dazu wurden die Zellen erneut mit 15 μ l Antikörper-Lösung für 30min bei 4°C und Dunkelheit inkubiert und danach gewaschen. Bei weiteren Antigen-Färbungen oder der Verwendung von Sekundär-Antikörpern wiederholten sich die Schritte entsprechend.

Nach einem letzten Waschschriff wurden die Objektträger bei RT getrocknet. Die Zellfelder wurden mit Mounting Medium (DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium S3023, DakoCytomation, Denmark) beschichtet, mit einem Deckglas (24x60mm, #1, Menzel-Gläser) bedeckt und die Ränder mit kommerziellem Nagellack versiegelt. Die Aufbewahrung der Objektträger erfolgte bei 4°C und Dunkelheit.

2.2.8.4. Mikroskopie

An der Universität Regensburg wurden die Objektträger in einem Fluoreszenzmikroskop von Zeiss mit ApoChrome analysiert. Am NKI in Amsterdam kamen ein Widefield Mikroskop sowie ein konfokales Mikroskop von Zeiss zum Einsatz. Falls nicht anders angegeben, wurden alle Aufnahmen bei 63facher Vergrößerung gemacht.

2.2.8.5. Analyse von Zellkonjugaten und Zellpolarisierungen

T-Zellen erkennen Target-Zellen in Kokulturen durch direkten Zellkontakt. Dem folgt die Polarisierung der T-Zelle durch die Translokation des MTOC an die Kontaktstelle. Dadurch können z.B. lytische Granula entlang des Spindelapparats zur Zellsynapse transportiert und ausgeschüttet werden. Die verschiedenen PD-1-Genotypen der 2C T-Zellen sollten hinsichtlich ihrer Fähigkeit zu dieser MTOC-Translokation untersucht werden. Dazu wurden Tubulin-gefärbte Präparate statistisch analysiert. Es wurden jeweils gleich viele Gesichtsfelder ausgezählt und folgende T-Zellen unterschieden: Alle T-Zellen; T-Zellen mit Kontakt zu Tumorzellen, jedoch ohne MTOC-Polarisation an der Kontaktstelle; T-Zellen mit Kontakt zu Tumorzellen und der entsprechenden MTOC-Polarisation an der Kontaktstelle.

2.2.9. Statistik

Für statistische Analysen wurden die Programme SigmaPlot und Microsoft Excel verwendet. Die Ergebnisse wurden stets als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben. Die Daten verschiedener Gruppen wurden mit Hilfe des Student t-Tests miteinander verglichen. Werte von $p < 0,05$ wurden dabei als statistisch signifikant betrachtet und in den Abbildungen mit * gekennzeichnet. Werte von $p < 0,01$ wurden dabei als statistisch hoch signifikant betrachtet und in den Abbildungen mit ** gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. T-Zell-Stimulation mit Beads

Die Daten von Bennett hatten nahegelegt, dass das über den Rezeptor PD-1 vermittelte Signal nur dann die TCR-Aktivierung beeinflussen kann, wenn beide Rezeptoren, sowohl für PD-L1 als auch für das TCR-spezifische Antigen, in unmittelbarer Nähe zu einander liegen.

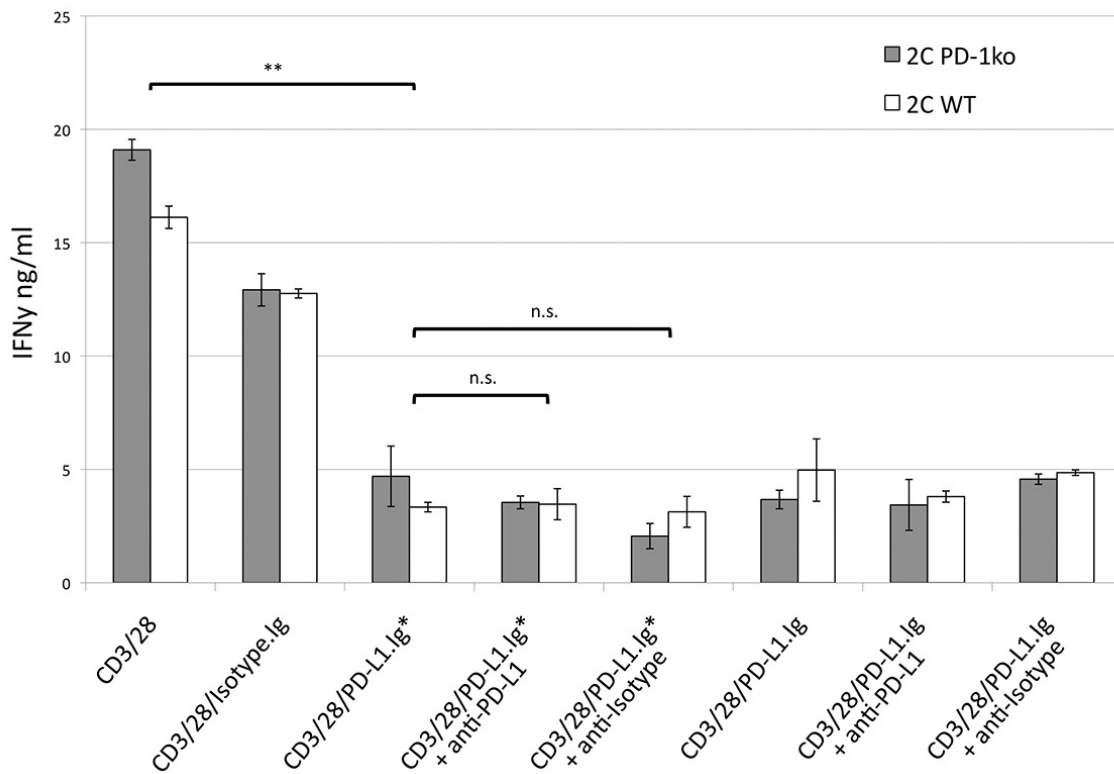


Abbildung 3.1.: Zytokin-Produktion nach Bead-Stimulation: Die Zytokin-Produktion nach Stimulation mit anti-CD3-/anti-CD28-beschichteten Beads ist PD-1-unabhängig. Die Zugabe von PD-L1 (PD-L1.Ig) führt sowohl in An- wie Abwesenheit von PD-1 zu einer Produktionsminderung, im Gegensatz zu Kontroll-Immunglobulin (Isotyp.Ig). Anwesenheit von Fluorochrom (PD-L1.Ig* = Alexa-Fluor-488 gelabeltes PD-L1) hat keine Auswirkung, ebenso wie antikörper-gestützte Ligandenblockade mit anti-PD-L1-Antikörpern.

Um den Einfluss von PD-1 zu verifizieren, verwendeten wir – gemäß Bennetts Versuchsaufbau – in der Kokultur mit T-Lymphozyten ferromagnetische Beads als Signalgeber, die mit anti-CD3- und anti-CD28- Antikörpern als Stimuli, sowie mit PD-L1.Ig bzw. einem Kontroll-Isotyp-Immunglobulin beschichtet wurden. Als Signalempfänger kamen neben normogenen murinen CD8⁺ T-Zellen auch Pdc1-defiziente CD8⁺ Lymphozyten zum Einsatz. Überraschenderweise zeigte sich zwischen diesen beiden Genotypen kein signifikanter Unterschied in der Zytokin-Produktion nach Bead-Kokultivierung. Vielmehr produzierten beide Zellstämme in Anwesenheit von PD-L1.Ig weniger IL-2- und IFN- γ , als wenn anti-CD3/28 alleine oder in Kombination mit Isotyp.Ig auf den Beads gebunden war. Die Zugabe von anti-PD-L1-Antikörpern, die den Liganden und damit die inhibitorische Wirkung des PD-L1/PD-1-Signalwegs blockieren, hatte weder auf die Wildtyp CD8⁺ Zellen noch auf die PD-1ko T-Zellen einen Einfluss und unterschied sich von der Auswirkung her nicht vom Effekt von Isotyp-Kontrollantikörpern. (Abbildung 3.1)

Es stellte sich die Frage, ob diese identische PD-L1.Ig vermittelte T-Zell-Hemmung – auch bei PD-1 defizienten T-Zellen – durch eine tatsächliche liganden-vermittelte Inhibition, z.B. durch einen anderen Rezeptor für PD-L1, oder durch eine mangelhafte Stimulation der T-Zellen bedingt war.

Um die Effektivität der Bead-Kopplung zu untersuchen, wurden fluorochrom-konjugierte Antikörper bzw. Immunglobuline gewählt. Nach Beschichtung der Beads mit diesen farbmarkierten Proteinen konnte die Konzentration an Fluorochromen auf den Beads mittels Durchflusszytometrie evaluiert werden, um den Rückschluss auf die Bindungseffektivität zu ermöglichen. Während der Bead-Beschichtung wurde die Reihenfolge, in der die Proteine mit den Beads inkubiert wurden, variiert: entweder wurden zuerst die Proteine PD-L1.Ig bzw. Isotyp.Ig den Beads zugefügt und erst im zweiten Schritt mit anti-CD3/28 inkubiert; oder es wurden sowohl die Proteine als auch die Antikörper gleichzeitig zugegeben; oder es erfolgte zuerst die Antikörper-Beschichtung und erst danach die Protein-Inkubation.

Als Ausgangsgröße wurde durchflusszytometrisch die Positivität der Fluorochrome an anti-CD3 bzw. anti-CD28 nach alleiniger Beschichtung mit eben diesen Antikörpern ohne weitere Zusätze gemessen. Es stellte sich heraus, dass die Anwesenheit von Isotyp.Ig in der Standard-Konzentration keinen negativen Einfluss auf die Kopplung von anti-CD3/28 hat, unabhängig von der Reihenfolge: die anti-CD3/28-Konzentrationen waren vergleichbar zu den Beads, die nur mit anti-CD3/28, aber ohne Isotyp.Ig inkubiert worden waren. In Anwesenheit von PD-L1.Ig hingegen nahm die Signalintensität sowohl

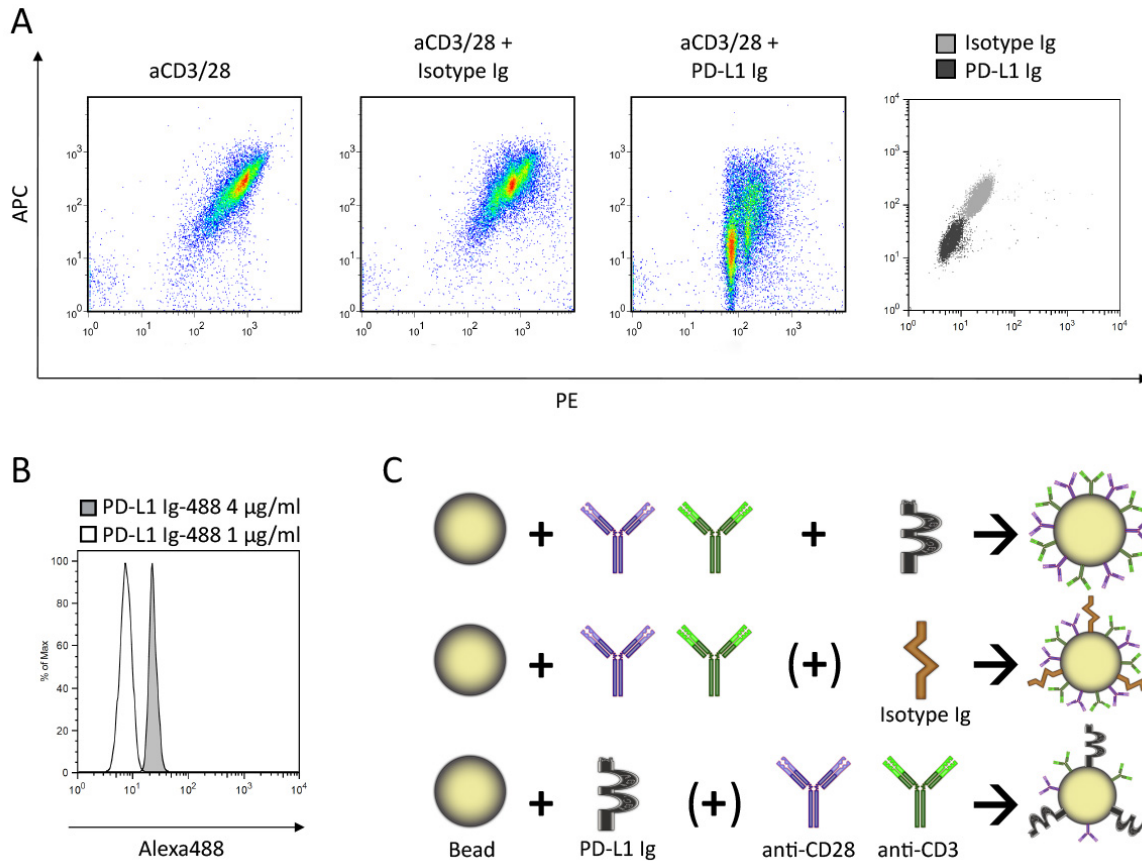


Abbildung 3.2.: Antikörper-Dichte auf Beads. A: Beads wurden mit fluorchrom-gelabelten anti-CD3-Antikörpern (PE) bzw. anti-CD28-Antikörpern (APC) entweder alleine, in Anwesenheit von Isotyp.Ig oder in Anwesenheit von PD-L1.Ig inkubiert und die Antikörperbindung mittels FACS-Signalintensität dargestellt. In Anwesenheit von PD-L1.Ig findet sich im Gegensatz zu Isotyp.Ig die geringere Dichte der CD3/28-Antikörper auf den Beads. B: Die PD-L1.Ig-Bindung auf den Beads ist konzentrationsabhängig. C: Der Verdrängungseffekt ist abhängig von der Reihenfolge der Beschichtung: nur bei gleichzeitiger oder vorangehender Zugabe von PD-L1.Ig werden die Antikörper sterisch verdrängt. Die Verdrängung durch Isotyp.Ig ist so gering, dass die Reihenfolge keine Rolle spielt.

von anti-CD3 als auch von anti-CD28 ab, wenn PD-L1.Ig vor oder gleichzeitig mit anti-CD3/28 zu den Beads gegeben wurde. Erfolgte erst die Beschichtung mit anti-CD3/28 und im Anschluss mit PD-L1.Ig, war die Konzentration von anti-CD3/28 ungemindert. (Abbildung 3.2)

Dies lässt eine verringerte Bindung der Antikörper an die Beads aufgrund einer sterischen Inhibition durch PD-L1.Ig vermuten. Bei gleichzeitiger Zugabe scheint PD-L1.Ig eine höhere Bindungsaffinität zu den Beads zu haben, als die konkurrierenden anti-CD3/28-Antikörper.

Es stellte sich daher die Frage, ob diese sterische Inhibition, die unter anderem von

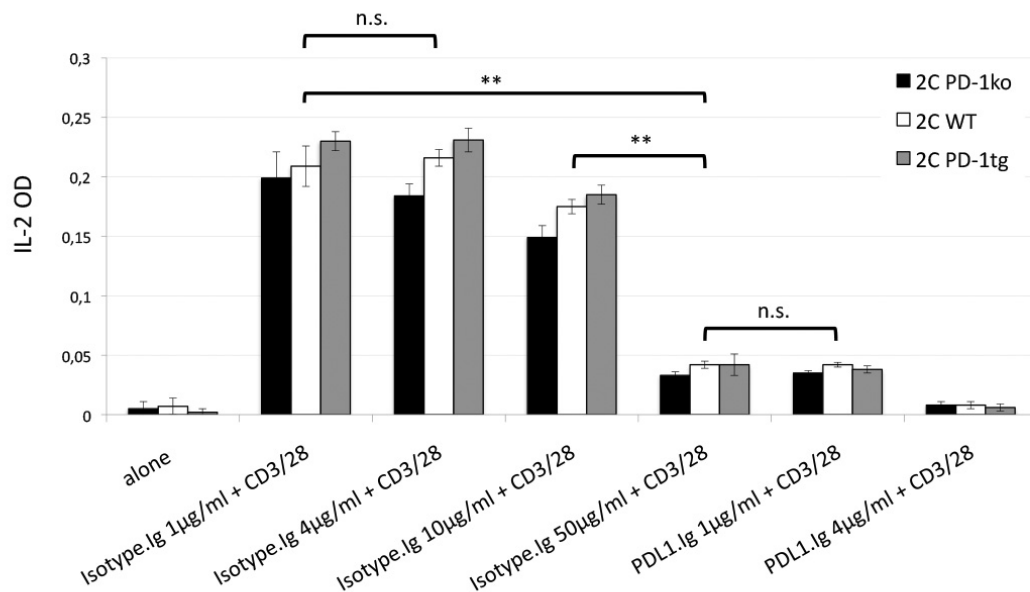


Abbildung 3.3.: Zytokin-Produktion nach Bead-Stimulation: Während der anti-CD3/28-Antikörper-Beschichtung der Beads wurde Isotyp.Ig in einer steigenden Konzentrationsreihe zugefügt. Die Zytokin-Produktion nach Stimulation mit anti-CD3/28-PD-L1.Ig-Beads sank bei steigender Konzentration von Isotyp.Ig. Bei höchster Isotyp.Ig-Konzentration ist der gleiche Verdrängungseffekt wie bei niedrigster PD-L1.Ig-Konzentration erreicht.

Proteineigenschaften, Größe und Konformation des Moleküls abhängt, eventuell durch Konzentrationsänderungen simulierbar bzw. erzwingbar ist. Eine Titration von Isotyp.Ig demonstrierte den kompetitiven Charakter der Protein-Bead-Bindung. Bei gleicher Konzentration von Isotyp.Ig wie PD-L1.Ig in der Coating-Lösung zeigte sich kein inhibiertes Bindungsverhalten der übrigen Antikörper. Mit steigender Zugabe von Isotyp.Ig sank jedoch die Dichte von anti-CD3/28-Antikörpern auf den Beads.

Um den Einfluss und eventuelle Wechselwirkungen zwischen aktivierenden und inhibitorischen Liganden zu vergleichen, führten wir die Zytokin-Messung auch mit der Isotyp-Titrationsreihe durch. Es zeigte sich, dass die Produktion von IL-2 und IFN- γ von der Konzentration von anti-CD3/28 auf den artifiziellen APCs abhängt. Hohe Isotyp.Ig-Konzentrationen führten über die verminderte Bindung von anti-CD3/28 an die Bead-Oberfläche auch zu geringerer Zytokin-Produktion. Mangelhafte Stimulation ist wahrscheinlich ausschlaggebender für die fehlende T-Zell-Aktivierung als die durch PD-L1 vermittelte Inhibition. (Abbildung 3.3)

Der Einsatz von PD-1 defizienten T-Zellen hatte somit gezeigt, dass das Bead-Setting

keine ausreichende Stimulationsbedingung ermöglicht. Daher lässt sich jedoch auch keine Aussage zur Lokalisation von PD-L1 auf den APCs oder PD-1 auf den T-Zellen ableiten.

3.2. T-Zell–Tumor–Interaktion

Die Bead-Experimente hatten somit aufgrund unzureichender Stimuli bei gleichzeitiger Anwesenheit von PD-L1.Ig keine zweifelsfreie Aussage über die Lokalisierung von PD-1 und dessen Wirkung während der T-Zell-APC-Interaktion zugelassen. Um diese Hürde der künstlichen APCs zu überwinden, sollte der Einfluss der Lokalisation von PD-1 auf die TCR-Aktivierung in einem Modell mit Tumorzellen als APCs untersucht werden. Die Fragestellung wurde anhand des 2C TCRtg Mausmodells, das im Methodenteil beschrieben ist, *in vitro* weiterverfolgt.

3.2.1. T-Zell-Stimulation mit p815.B7-1

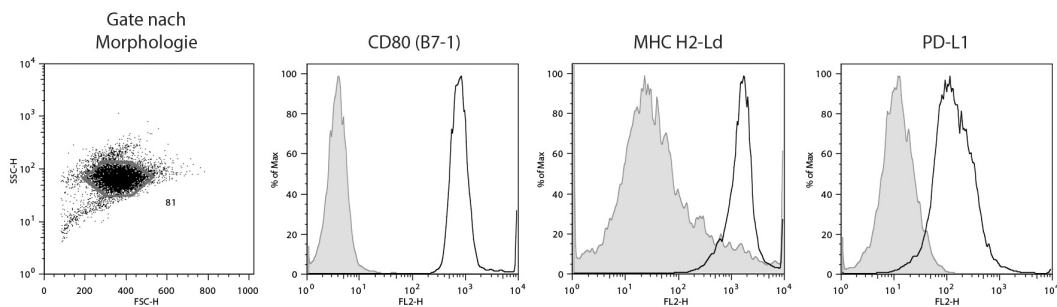


Abbildung 3.4.: p815.B7-1: Oberflächen-Expression von CD80, MHC-Komplex H2-Ld sowie PD-L1.

Das Maß der PD-1 Expression ist abhängig vom Grad der Aktivierung der T-Zellen. Für die Untersuchung der Lokalisation von PD-1 und dessen Einfluss auf die T-Zell-Funktionalität standen uns im Rahmen der TCR transgenen murinen Zellen drei genotypisch unterschiedliche Mausmodelle zur Verfügung. PD-1 defiziente Mäuse (PD-1ko) exprimieren kein PD-1 auf der Zelloberfläche; Wildtyp-Mäuse (WT) sind hinsichtlich des PD-1-Gens unmodifiziert; Zellen aus PD-1 transgenen Mäusen (PD-1tg) überexprimieren PD-1 auf der Oberfläche. Um zunächst die Aktivierungsabhängigkeit in besagten Modellen zu analysieren, erfolgte die Stimulation der naiven CD8⁺ T-Zellen nach Aufreinigung mit der Tumorzelllinie p815.B7-1. Wie im Methodenteil beschrieben ermöglicht dies optimale Stimulationskonditionen, da die Tumorzellen sowohl mittels MHC-Komplex einen antigen-abhängigen TCR-Stimulus als auch durch die gen-modifizierte B.7-1 Expression einen CD28-bindenden Kostimulus liefern. (Abbildung 3.4)

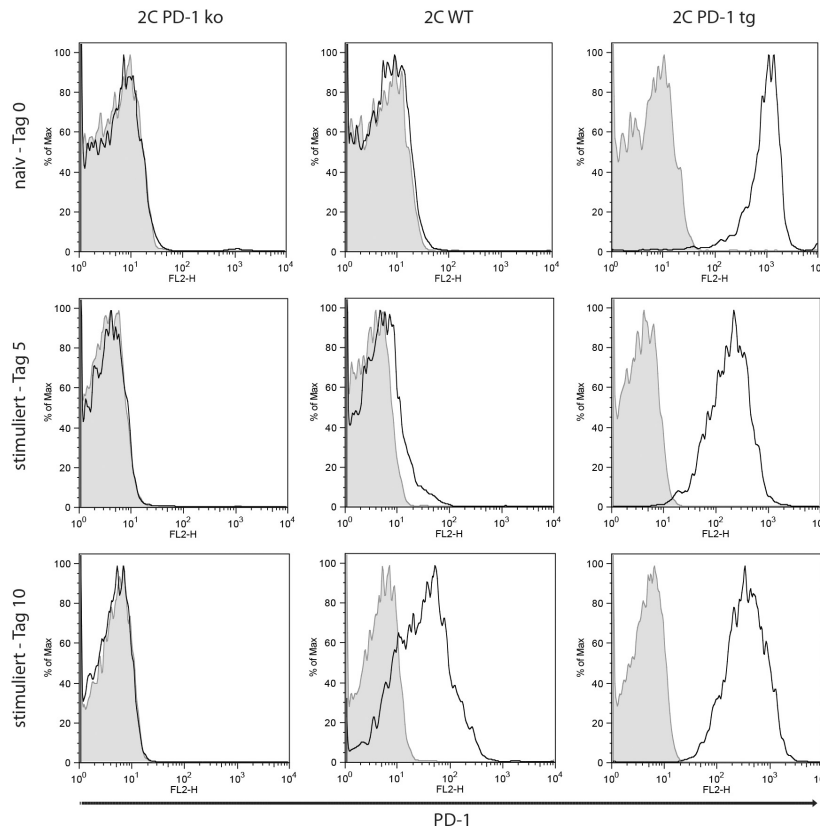


Abbildung 3.5.: Kinetik von PD-1 auf 2C TCRtg T-Zellen nach 1 (5 Tage) bzw. 2 (10 Tage) Runden Stimulation mit p815.B7-1: Während Wildtyp-Lymphozyten erst nach TCR-Stimulierung und Proliferation die PD-1-Expression beginnen und steigern, exprimieren PD-1tg T-Zellen bereits im naiven Zustand PD-1; PD-1-defiziente T-Zellen tragen weder naiv noch stimuliert PD-1 auf der Oberfläche)

Die 2C TCRtg CD8⁺ Lymphozyten wurden entsprechend im frisch aufgereinigten, naiven Zustand wie auch in den weiteren Schritten der Stimulation durchflusszytometrisch für Oberflächenmarker phänotypisiert. Die Veränderung der PD-1 Expression konnte im Zeitverlauf aufgezeigt werden: Sowohl im naiven wie auch nach wiederholten Aktivierungsschritten konnte anhand der eingesetzten kommerziellen anti-PD-1-Antikörper kein Nachweis von PD-1 auf den *Pdcd1*-gendefizienten (PD-1ko) CD8⁺ T-Zellen erbracht werden. Somit konnte auch für die folgenden Versuche sichergestellt werden, dass in den PD-1ko Zellen auch nach T-Zell-Stimulation kein PD-1 exprimiert wird. Im Gegensatz dazu war bei PD-1 transgenen (PD-1tg) T-Zellen nicht nur nach Aktivierung, sondern bereits im naiven Zustand PD-1 konstitutiv überexprimiert. In Wildtyp T-Zellen zeigte sich das bereits vorbeschriebene Muster: aktivierte, nicht aber naive CD8⁺ Zellen exprimierten PD-1, mit der höchsten Expression nach 10 Tagen bzw. nach 2 Stimulationsrunden. Durchflusszytometrisch konnte in den eingesetzten T-Zell-Linien sowohl

die Antikörper-Spezifität als auch der T-Zell-Phänotyp hinsichtlich der PD-1-Expression bestimmt werden. PD-1 wird in den Wildtyp-Lymphozyten unseres Mausmodells durch Stimulation hochreguliert. Der erfolgreiche FACS-Nachweis bedeutet auch, dass die Spezifität des Antikörpers für PD-1 unabhängig vom Aktivierungsgrad ist, d.h. dass PD-1 keiner Konformationsänderung im Rahmen der T-Zell-Aktivierung unterworfen ist, die einen Nachweis durch den eingesetzten Antikörper erschwert oder verändert hätte. (Abbildung 3.5)

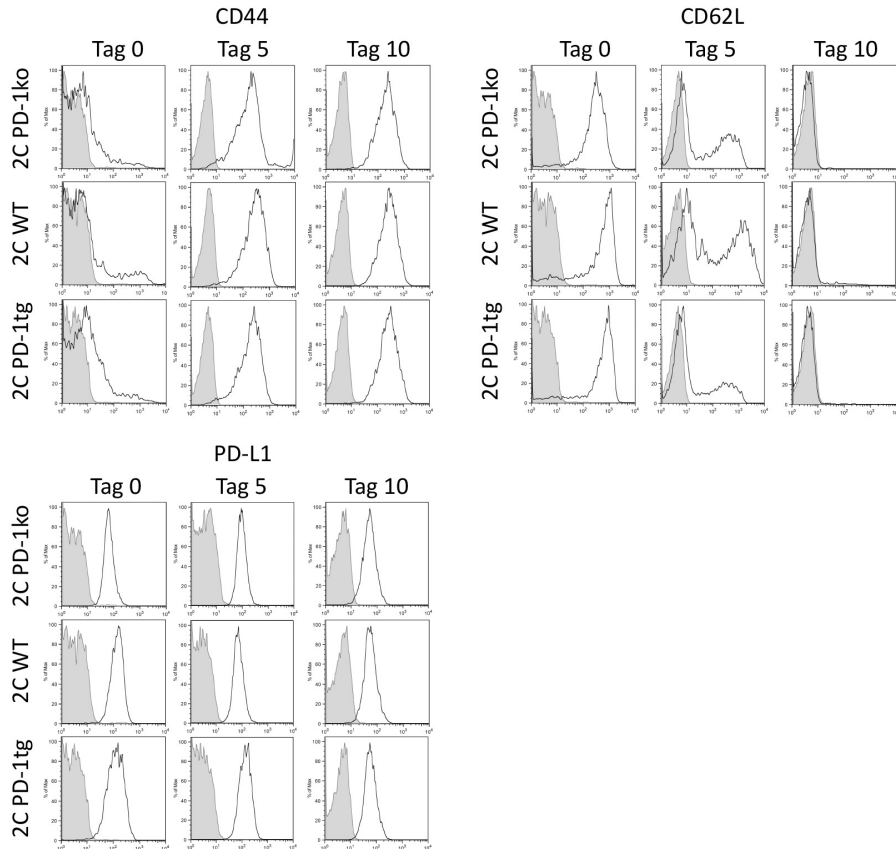


Abbildung 3.6.: Kinetik von Aktivierungsmarkern auf 2C TCRtg T-Zellen: Unabhängig vom PD-1-Genotyp zeigen alle 2C TCRtg $CD8^+$ Lymphozyten ein vergleichbares Muster hinsichtlich folgender Oberflächenmarker: CD44-Expression nach Stimulation, CD62L-Suppression nach Stimulation, PD-L1 ubiquitär unabhängig vom Aktivierungsgrad.

Die T-Zellen wurden zur Verifizierung der erfolgreichen Stimulation auf Aktivierungsmarker hin untersucht. Zum Einsatz kamen CD44, das eine Rolle bei Zell-, insbesondere Lymphozytenaktivierung und Zelldifferenzierung spielt und bei Aktivierung hochreguliert wird [63]. CD62L wird wiederum als Adhäsionsmolekül im Rahmen der T-Zell-

Aktivierung vermindert exprimiert. Unabhängig von der PD-1-Genetik war der naive Phänotyp aller Lymphozyten CD44-low und CD62L-high. Nach Stimulation folgte PD-1-unabhängig die Konversion zu CD44-high und CD62L-low. Die Expression von PD-L1 auf T-Zellen blieb PD-1- und aktivierungs-unabhängig stabil positiv. (Abbildung 3.6) Gleiches konnte ferner für CD80, das ebenfalls nach T-Zell-Stimulation verstärkt exprimiert wird, und CD86, Liganden für CD28, gezeigt werden: während CD80 im Verlauf der Stimulation hochreguliert wurde und CD86 stabile Expressionslevels beibehielt, fand sich im Vergleich zwischen den PD-1-Genotypen kein Unterschied im Bezug auf CD80, jedoch eine leicht erhöhte Expression von CD86 bei PD-1ko Zellen im Vergleich zu PD-1tg Zellen. Dass sich diese CD86-Expressionsunterschiede auf die T-Zell-Funktionalitätstests gerade in Abhängigkeit der PD-1-Präsenz auswirken, kann ausgeschlossen werden, da nur bei der Interaktion zwischen PD-1 und CD80, nicht jedoch bei PD-1 und CD86 ein relevanter Effekt nachgewiesen werden konnte. [24] (Abbildung 3.7)

Somit konnte gezeigt werden, dass die genetische Modifikation von PD-1 keinen Defekt des TCR zur Folge hatte, da die Stimulation und phänotypische Wandlung in den Aktivitätszustand unabhängig von der PD-1-Expression ablief.

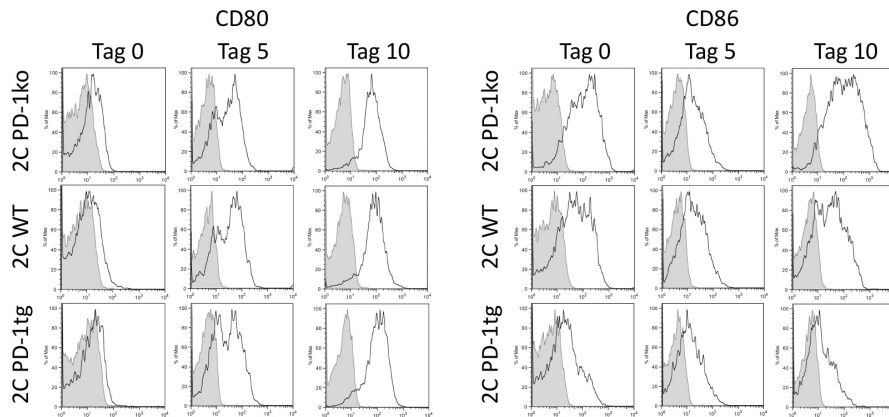


Abbildung 3.7.: Kinetik von CD80 und CD86 auf 2C TCRtg T-Zellen: Unabhängig vom PD-1-Genotyp oder dem Aktivierungsgrad zeigen alle 2C TCRtg CD8⁺ Lymphozyten ein vergleichbares Muster hinsichtlich der CD80-Expression, während bei CD86 eine erhöhte Expression bei PD-1ko Zellen im Vergleich zu PD-1tg Zellen erkennbar ist.

Das identische Verhalten der verschiedenen PD-1-Genotypen hinsichtlich der Oberflächenmarker - mit Ausnahme von PD-1 - wurde auch bei der Analyse der Expansionsmuster nach optimaler Stimulation evident. Repetitive Stimulationen der T-Zellen führten anfangs, unabhängig von der PD-1-Expression, zu starker Expansion aller T-Zell-

Reihen. Im Verlauf kam es bei allen PD-1-Genotypen gleichermaßen zu einem Rückgang der Proliferation, im Sinne einer „Exhaustion“. In unserem Modell hat PD-1 keine exklusive Rolle für die Ausbildung der „Exhaustion“, da sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen T-Zell-Arten erkennen ließ. (Abbildung 3.8)

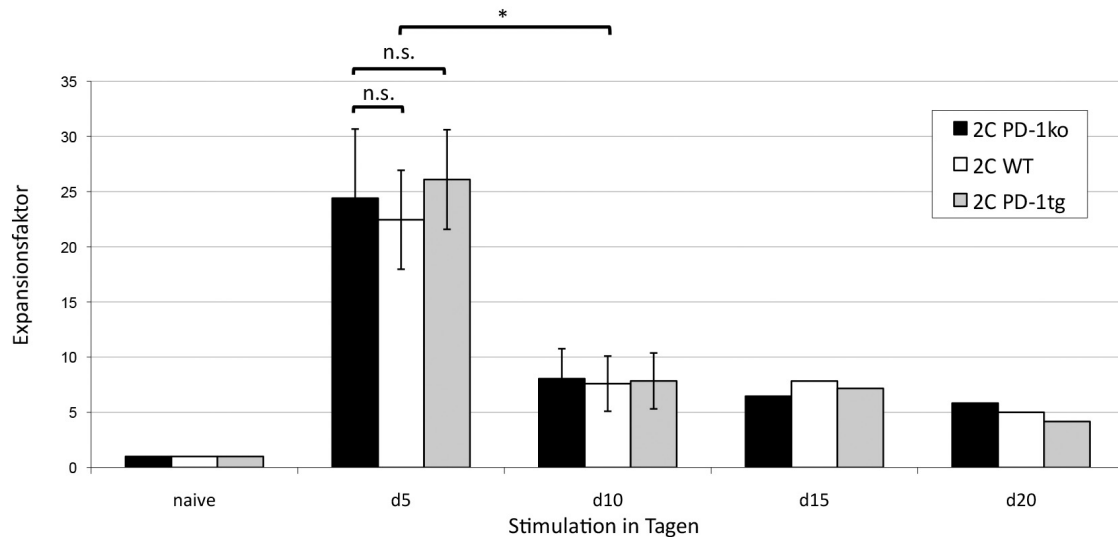


Abbildung 3.8.: Expansionsfaktoren nach Stimulationsrunden: Nach jeder Runde Stimulation der aufgereinigten 2C TCRtg T-Zellen mit bestrahlten Target-Tumorzellen p815.B7-1 (5 Tage pro Runde) wurde die Expansion als Faktor der ursprünglichen Zellzahl gemessen. Nach erstmaliger Kokultivierung erfolgte PD-1 unabhängig eine schubartige Expansion mit Zellzahlvermehrung bis zum 30-fachen Ausgangswert, während weitere Kokultivierungen nur noch geringere Expansionen provozieren konnte.

Zusammengefasst ist durch die Phänotypisierung und die Expansion abzuleiten, dass die PD-1-Gen-manipulierten T-Zellen keine anderweitige Veränderung der T-Zell-Rezeptor-Aktivierung bzw. T-Zell-Defekte erfahren haben.

3.2.2. Funktionalitätsassays von 2C T-Zellen versus B16.SIY Tumoren

Um den Einfluss von PD-1 auf die Funktionalität der T-Zellen in Anwesenheit eines entsprechenden PD-1-Liganden zu untersuchen, entschieden wir uns für die Tumorzell-Linie B16.SIY. Erst nach Inkubation mit IFN- γ exprimiert dieser Tumor neben MHC-I-Peptid-Komplexen, die spezifisch von 2C TCR erkannt werden, auch PD-L1, während ein Kostimulus wie CD80 zu keiner Zeit präsentiert wird. Im Folgenden wird B16.SIY nach Interferon-Exposition als B16.SIY.IFN abgekürzt. (Abbildung 3.9)

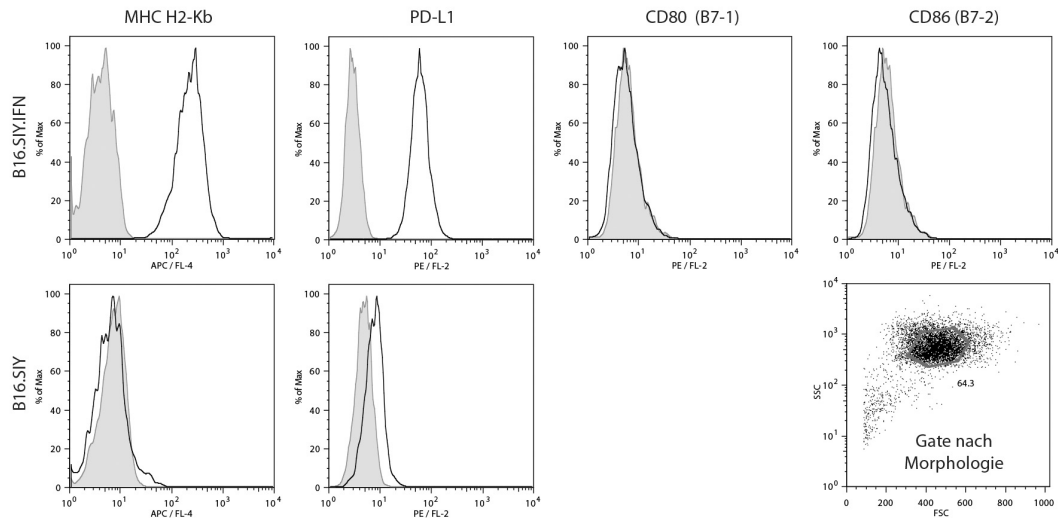


Abbildung 3.9.: Phänotyp des Tumors B16.SIY naiv und nach IFN- γ -Exposition: Die Tumorzellreihe exprimiert PD-L1 und den MHC-Komplex H2-Kb nur nach Exposition mit IFN- γ über 48h (B16.SIY.IFN), nicht jedoch im naiven Zustand (B16.SIY). CD80 und CD86 werden weder auf B16.SIY.IFN (rechts oben) noch auf B16.SIY (nicht gezeigt) exprimiert.

3.2.2.1. Verminderte Zytokinproduktion bei transgener Überexpression von PD-1

T-Zellen, die eine Zelle als fremd erkannt haben, produzieren Zytokine wie IFN und IL-2. Die Zytokinproduktion, hier IFN- γ und IL-2, von CD8⁺ Lymphozyten wurde mithilfe der ELISA-Technik erfasst.

In der Kokultur von (mit p815.B7-1 stimulierten) CD8⁺ T-Zellen mit B16.SIY konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zytokinsekretion zwischen den drei T-Zell-Reihen – 2C PD-1ko, 2C WT und 2C PD-1tg – festgestellt werden. Dabei entsprach die Produktion in Anwesenheit von B16.SIY der von Kokulturen mit den Tumorzellen EL4, die als Negativkontrolle eingesetzt wurden. Diese Werte entsprechen aufgrund des fehlenden TCR-Stimulus also der Basisproduktion von prä-aktivierten T-Zellen.

Nach Kokultur der stimulierten T-Zellen mit IFN-vorbehandelten B16.SIY Tumorzellen fand sich in T-Zellen, die PD-1 überexprimierten, eine nur minimal erhöhte Produktion an IFN- γ im Vergleich zu oben besagter Negativkontrolle. Die größte Menge an IFN- γ konnte bei 2C PD-1ko T-Zellen gemessen werden, während Wildtyp T-Zellen deutlich weniger, jedoch mehr als PD-1tg Zellen sezernierten. Die PD-1-Expression führt also zu einer Hemmung der Zytokin-Produktion. (Abbildung 3.10)

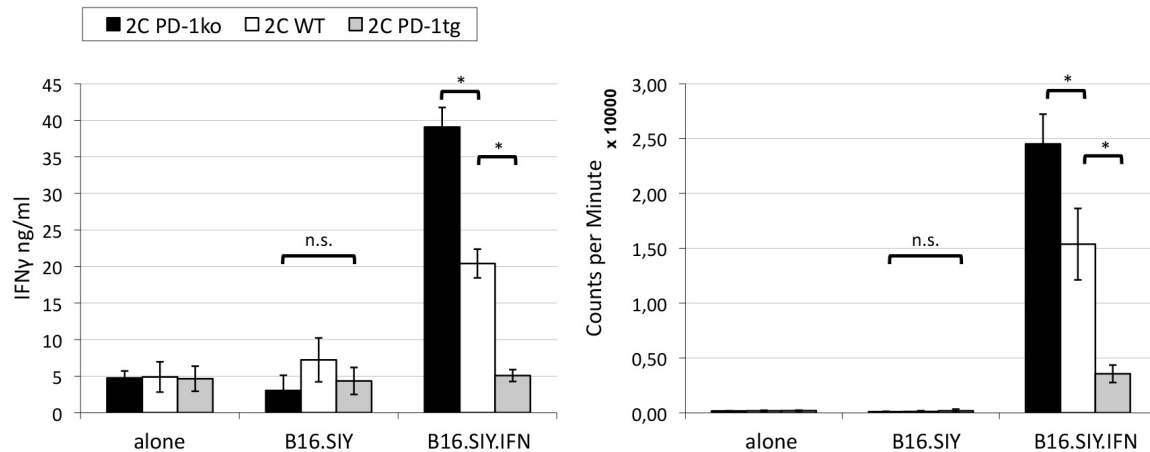


Abbildung 3.10.: 2C Zytokin-Produktion und Proliferation: Stimulierte 2C TCRtg T-Zellen wurden mit Zieltumorzellen kokultiviert und die Zytokin-Produktion (links) bzw. Proliferation (rechts) gemessen. PD-1ko T-Zellen produzieren nach Kontakt mit dem Target-tumor B16.SIY.IFN am meisten IFN- γ und proliferieren am stärksten im Vergleich zur mittelgradigen IFN- γ -Produktion und Proliferation von Wildtyp-Lymphozyten, während PD-1tg T-Zellen die geringste Funktionalität zeigen. Die Kokultivierung mit den Tumorzellreihen B16.SIY oder EL4 (nicht gezeigt) als Negativ-Kontrollen führte zu keiner nennenswerten Zytokin-Produktion oder Proliferation.

3.2.2.2. Höchste Zellproliferationsrate bei PD-1-Abwesenheit

Vergleichbar mit der Zytokinproduktion, kommt es durch die T-Zell-Aktivierung auch zu einer Vermehrung der T-Zellen. Analog zur Zytokinbestimmung wurden wieder PD-1ko, Wildtyp und PD-1tg 2C T-Zellen mit B16.SIY bzw. B16.SIY.IFN kokultiviert und mittels Tritium-Thymidine-Assay hinsichtlich der Zellteilung analysiert. (Abbildung 3.10) Die Ergebnisse sind direkt vergleichbar mit der Zytokinproduktion. Eine relevante Proliferation konnte bei keiner der T-Zell-Reihen weder in Anwesenheit von B16.SIY noch der Negativkontrolle EL4 beobachtet werden. Kokultivierung mit B16.SIY, das zuvor IFN- γ ausgesetzt worden war, führte bei PD-1 defizienten T-Zellen zur höchsten Zellteilungsrate, während PD-1tg Zellen am langsamsten proliferierten. Wildtyp-Lymphozyten expandierten geringer als PD-1ko, aber rascher als PD-1tg T-Zellen. Dies führt auch hier zur Schlussfolgerung, dass die Expression von PD-1 die Zellteilung und damit die T-Zell-Aktivierung negativ beeinflusst.

3.2.2.3. Höchste Zytotoxizität bei PD-1-Abwesenheit

CD8⁺ T-Zellen sezernieren nach positiver Antigen-Erkennung neben Zytokinen auch zytotoxische Substanzen, um die Zielzelle zu lysieren. Um die Zytotoxizität zu bestimmen, kamen zwei Assays zum Einsatz.

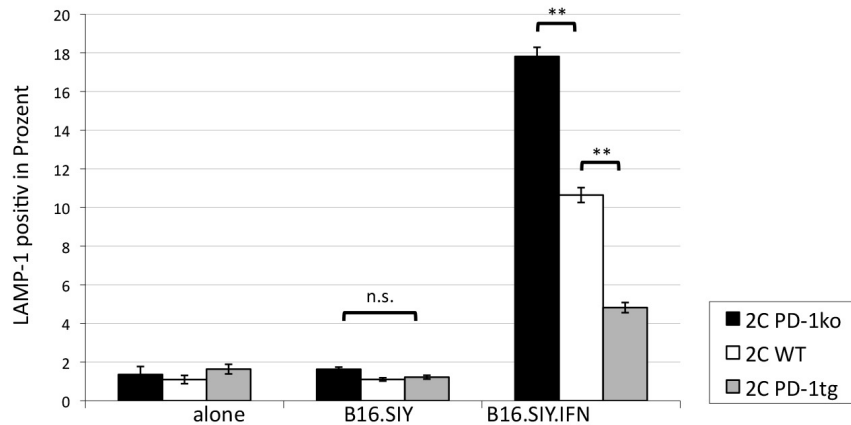


Abbildung 3.11.: 2C Zytotoxizität: Stimulierte 2C TCRtg T-Zellen wurden mit Zieltumorzellen kokultiviert und die Expression von CD107a/LAMP als Zeichen der Ausschüttung zytotoxischer Granula gemessen. Das Fehlen von PD-1 führte zur effektivsten Produktion zytolytischer Granula in 2C TCRtg T-Zellen, während PD-1-Überexpression im Vergleich zu Wildtyp-Lymphozyten noch geringere zytolytische Aktivität zeigte. Die Negativ-Kontrollen mit EL4 (nicht gezeigt) und B16.SIY provozierte keine nennenswerte LAMP-Expression.

Beim Chrome-Release-Assay misst man die eigentliche Lyse anhand der Freisetzung von Radioaktivität aus mit Chrom beladenen Zielzellen. Beim LAMP-Test wird die Sekretion zytotoxischer Substanzen indirekt durch den Nachweis lytischer Granula an der Zelloberfläche bestimmt. Die Durchführung des Chrome-Release-Assay erbrachte aufgrund technischer Schwierigkeiten keine reproduzierbaren Ergebnisse.

Im LAMP-Test konnte aber valide das gleiche Muster wie bei Zytokinproduktion und Proliferation gezeigt werden: Nach Kokultivierung mit B16.SIY und der Negativkontrolle EL4 war kaum LAMP-1 auf den T-Zell-Reihen, unabhängig von der PD-1-Expression, nachweisbar. Die Exposition von T-Zellen mit B16.SIY.IFN resultierte in geringer LAMP-1-Positivität bei PD-1tg T-Zellen, mittlerer Expression bei Wildtyp Lymphozyten und den höchsten Werten bei PD-1ko T-Zellen. Daraus ist ableitbar, dass PD-1-Überexpression im Vergleich zu PD-1-Abwesenheit eine Verminderung der Zytotoxizität zur Folge hat. (Abbildung 3.11)

3.2.3. PD-L1 auf T-Zellen ohne Effekt auf T-Zell-Funktionalität

Den inhibitorischen Einfluss der PD-1-Signalwirkung auf die TCR-transgenen T-Zellen nach Exposition der T-Zellen mit PD-L1-exprimierenden Zieltumor-Zellen in unserem

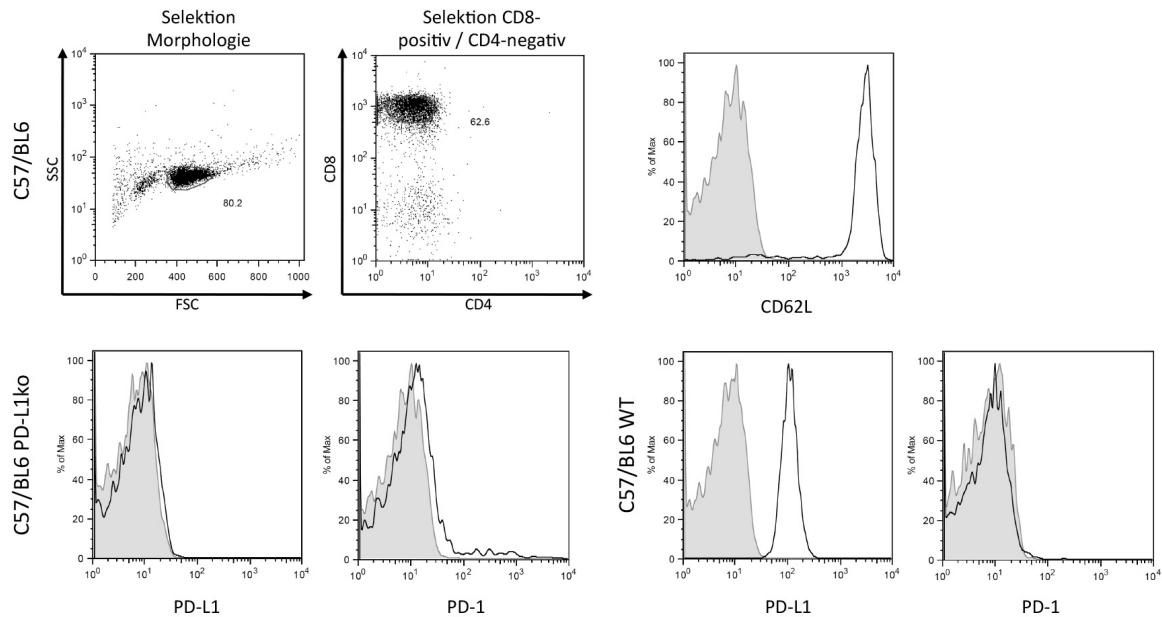


Abbildung 3.12.: Phänotypisierung von PD-L1-defizienten T-Zellen: naive CD62L-positive, PD-L1-ko C57/BL6 T-Zellen exprimieren im Gegensatz zu naiven CD62L-positiven Wildtyp C57/BL6 Lymphozyten kein PD-L1; PD-1 findet sich auf keiner der beiden Zellreihen im naiven Zustand.

Modell haben unsere obigen Experimente bewiesen. Neben PD-1 exprimieren T-Zellen unabhängig von der PD-1-Expression auch PD-L1 auf der Oberfläche. Es stellte sich daher die Frage, ob die T-Zellen sich mittels PD-L1/PD-1-Interaktion in ihrer Funktionalität selbst untereinander beeinflussen. Dazu setzten wir – zusammen mit den 2C transgenen Lymphozyten – Bystander-Lymphozyten vom C57/BL6-Background in Zytokin- und Proliferationsassays ein. Speziell kamen neben normogenen C57/BL6 Wildtyp Lymphozyten auch PD-L1-Gen-defiziente (PD-L1ko) T-Zellen zum Einsatz, die also kein PD-L1 auf der Zelloberfläche präsentieren können. (Abbildung 3.12, 3.13)

Es wurden somit Kokulturen unterschieden, in denen die 2C TCR transgenen CD8⁺ Lymphozyten – jeweils in PD-1-Expressions-Subgruppen unterteilt – neben den B16.SIY.IFN Zieltumor-Zellen auch Bystander-Lymphozyten exponiert wurden. In der Kontrolle konnte eine Interaktion von C57/BL6 mit B16.SIY.IFN ausgeschlossen werden: die C57/BL6 Lymphozyten erkennen – im Gegensatz zu den 2C T-Zellen – das SIY-Peptid auf B16.SIY.IFN nicht und werden daher vom Tumor nicht aktiviert. Gleiches gilt für die Kontrollgruppen, in denen als Zieltumor B16.SIY eingesetzt wurde, das ohne den notwendigen IFN-Stimulus weder das SIY-Peptid noch PD-L1 in ausreichender Konzentration exprimiert.

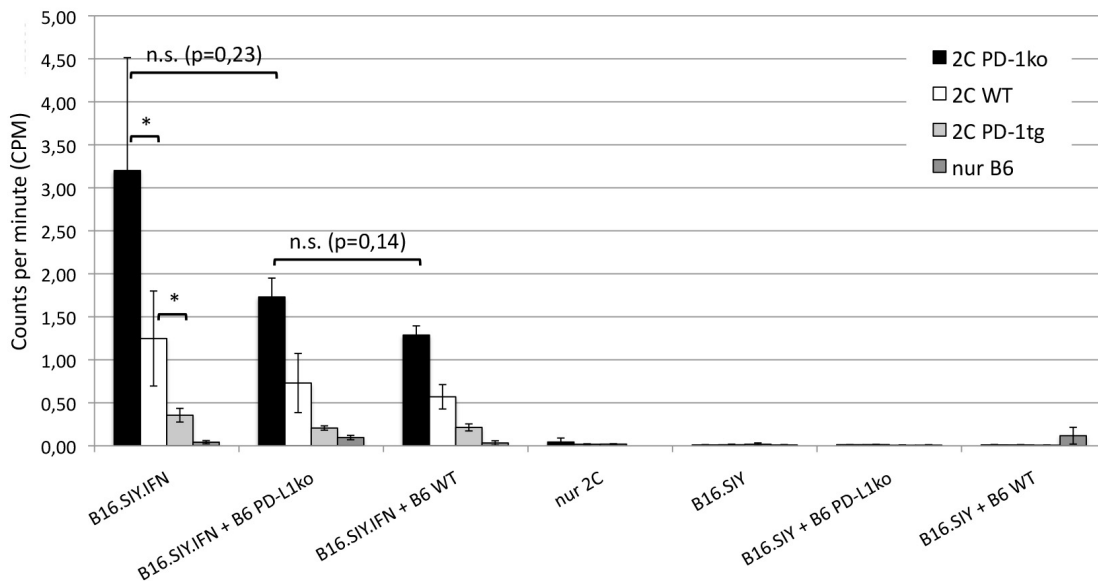


Abbildung 3.13.: Einfluss von lymphozytärem PD-L1 auf T-Zell-Proliferation: 10^5 2C TCRtg T-Zellen wurden mit 10^5 Tumorzellen (B16.SIY mit bzw. ohne vorherige IFN- γ -Exposition) entweder alleine, oder in Anwesenheit von 10^5 C57/BL6 Wildtyp T-Zellen, oder in Anwesenheit von 10^5 C57/BL6 PD-L1ko T-Zellen kokultiviert. Die Abwesenheit von lymphozytärem PD-L1 führt nicht zu einer verbesserten T-Zell-Proliferation, unabhängig vom PD-1-Genstatus. Die Kokultivierung mit B16.SIY führte aus mangelnder MHC-Expression zu keiner Zytokin-Produktion.

Vergleicht man – sowohl im Rahmen der Proliferationsassays als auch der Zytokin-Bestimmung – die T-Zell-Funktionalität im Bezug auf die PD-1-Konzentration auf 2C T-Zellen, zeigt sich das gleiche Muster wie bei obigen Experimenten, nämlich eine supprimierte Funktionalität bei PD-1-Überexpression, verglichen mit einer deutlichen Proliferations- und Zytokinproduktions-Steigerung bei PD-1-Abwesenheit.

Auf dieses Muster, wie auch die absolute Funktionalität, hatte die Anwesenheit der Bystander-Lymphozyten keinen signifikanten Einfluss. Diese Beobachtung war unabhängig von der Präsenz von PD-L1 auf den Bystander-Zellen: PD-L1ko T-Zellen verursachten im Vergleich mit Wildtyp-C57/BL6 T-Zellen keine Veränderung der Funktionalität von 2C Lymphozyten, unabhängig von der Expression von PD-1 auf 2C T-Zellen. Eine PD-1-getriggerte Inhibition der T-Zell-Funktionalität durch lymphozytäre PD-L1-Expression konnte somit nicht festgestellt werden. Die leicht verringerte Proliferationsrate der 2C Zellen bei Anwesenheit von C57/BL6 T-Zellen ist am ehesten auf die erhöhte absolute Zellzahl pro Ansatz und damit auf verringerte Energieversorgung aller Zellen durch Zellmedium-Mangel zurückzuführen. (Abbildung 3.14)

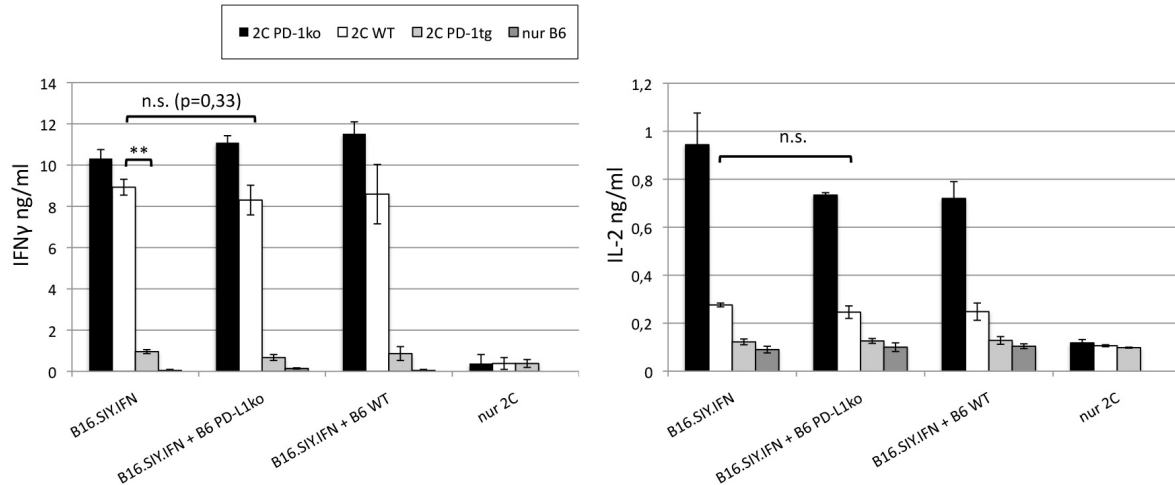


Abbildung 3.14.: Einfluss von lymphozytärem PD-L1 auf T-Zell-Funktionalität: 2C TCRtg T-Zellen wurden in Anwesenheit von PD-L1ko oder Wildtyp C57/BL6 Lymphozyten mit Tumorzellen kokultiviert. Die Zytokinproduktion (IFN- γ (links), IL-2 (rechts)) blieb von lymphozytärer PD-L1-Expression unbeeinflusst.

3.2.4. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die initiale Frage, ob die Lokalisationen von PD-1 und dem TCR während der T-Zell-Aktivierung eine Rolle spielen bzw. ob PD-1 und der TCR während der T-Zell-Tumorzell-Interaktion koloalisieren, konnte mit den bisherigen Methoden nicht beantwortet werden. Daher entschieden wir uns für eine bildgebende Analyse der Zellinteraktionen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Als CD8⁺ Lymphozyten kamen bereits oben etablierte 2C TCR transgene Zellen mit den drei unterschiedlichen *Pdcd1*-Genexpressionen (knockout versus Wildtyp versus transgen) zum Einsatz. Zur Vor-Stimulation wurden wie zuvor p815.B7-1 Tumorzellen eingesetzt. Für die Darstellung von T-Zell-Tumorzell-Interaktionen wurde als Zieltumor eine – in unserem Labor, siehe Material/Methoden – modifizierte Zelllinie von B16.SIY, nämlich B16.SIY.E12 gewählt, die durch Genmodulation kein GFP-Molekül exprimierte und somit kein Fehlsignal für die Immunfluoreszenz lieferte. Im Folgenden werden die Tumorzellen weiter als B16.SIY bzw. B16.SIY.IFN (wenn zuvor IFN-exponiert) bezeichnet. Für die Mikroskopie wurde die Färbung folgender Proteine etabliert: PD-1, PD-L1, CD3, 2C TCR und Tubulin/MTOC auf bzw. in Lymphozyten; PD-L1 und Tubulin/MTOC auf bzw. in B16.SIY.E12 Tumorzellen.

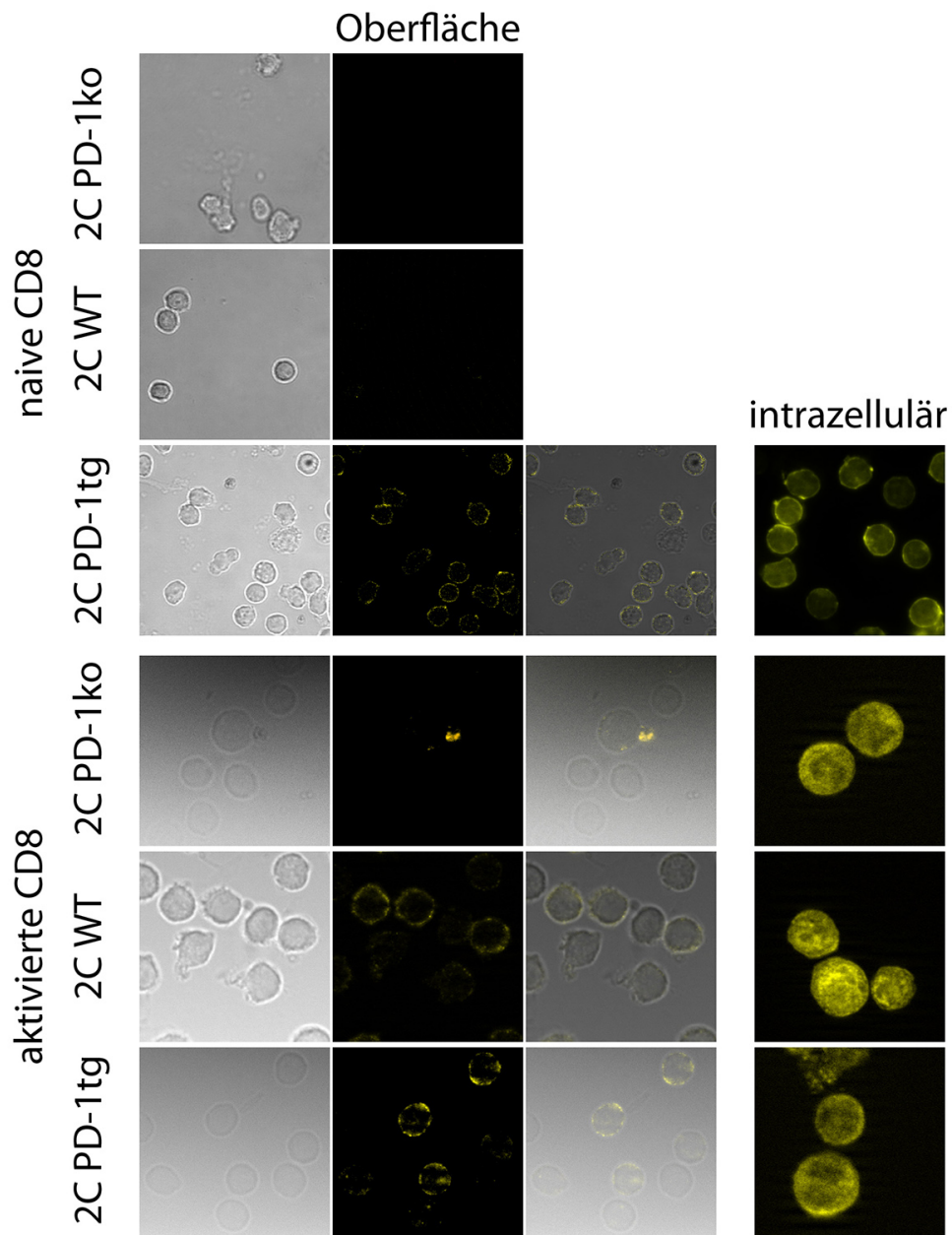


Abbildung 3.15.: Immunfluoreszenz - PD-1 auf T-Zellen: Naive und aktivierte T-Zellen wurden nur auf der Zelloberfläche vor der Fixierung (linke Spalte) bzw. intrazellulär nach Fixierung (rechte Spalte) mit fluorochrom-markierten anti-PD-1-Antikörpern gefärbt. PD-1 auf der Oberfläche ist nur auf aktivierten WT T-Zellen sowie auf naiven und aktivierten PD-1tg T-Zellen exprimiert, wobei nach Aktivierung die Expression v.a. in Clustern stattfindet. Intrazellulär ist PD-1 in allen Genotypen und unabhängig vom Aktivierungsstatus nachweisbar.

3.2.4.1. PD-1-Expression auf aktivierten T-Zellen in Clustern

Zunächst wurden nur T-Zellen, in Abwesenheit anderer Zellen, markiert und mikroskopisch beobachtet. Gemäß den FACS-Daten, exprimierten naive PD-1ko und Wildtyp T-Zellen kein PD-1. Auf naiven PD-1tg T-Zellen hingegen konnte PD-1 gleichmässig über die Oberfläche verteilt nachgewiesen werden. Nach der T-Zell-Aktivierung mit p815.B7-1 Mastozytom-Zellen blieb ausschließlich die PD-1ko 2C Zelllinie frei von PD-1-Expression, entsprechend ihrem Genotyp. Wildtyp 2C T-Zellen präsentierten zu diesem Zeitpunkt PD-1 auf der Oberfläche, jedoch in geringeren Konzentrationen als PD-1tg T-Zellen. Die Expression von PD-1 auf aktivierten T-Zellen erfolgte in Clustern. Auch die eher diverse Verteilung auf naiven PD-1tg T-Zellen veränderte sich durch Antigenerkennung zu einem mehr polarisierten Phänotyp mit einzelnen PD-1 Clustern. (Abbildung 3.15)

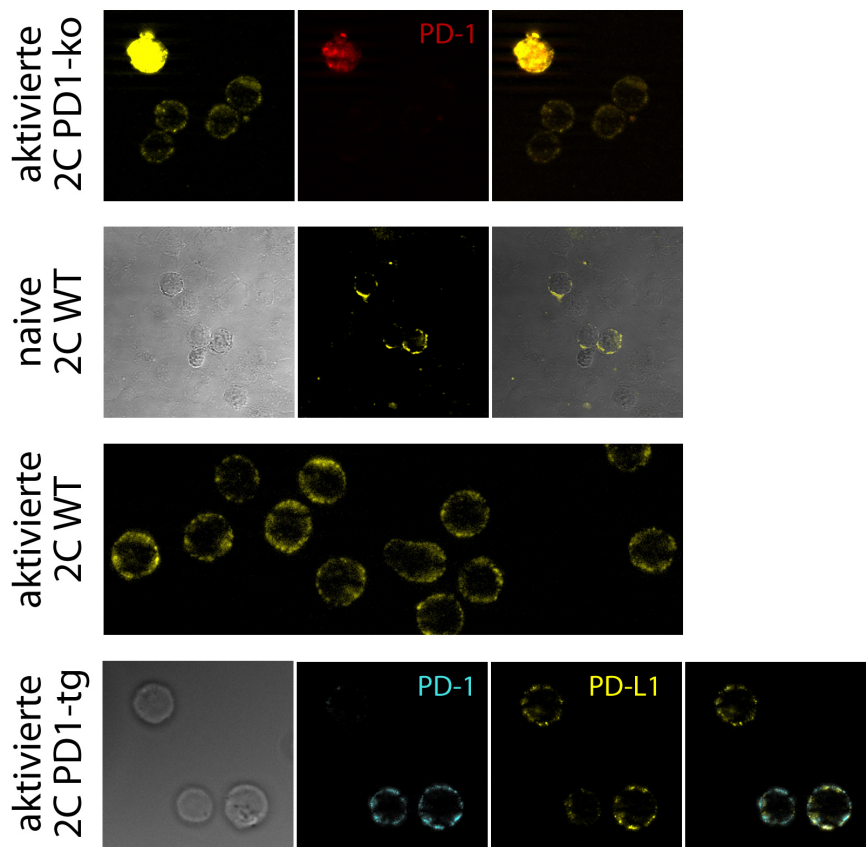


Abbildung 3.16.: Immunfluoreszenz - PD-L1 auf T-Zellen: PD-L1 wurde auf naiven und aktivierten T-Zellen markiert. Unabhängig vom PD-1-Genotyp und dem Status der Aktivierung wird PD-L1 ubiquitär exprimiert.

Analog zur PD-1-Färbung erfolgte die Untersuchung von PD-L1, TCR und MTOC. PD-

L1 konnte dabei in allen T-Zell-Reihen und zu allen Zeitpunkten positiv gefärbt werden. Die drei T-Zell-Reihen unterschieden sich weder in der Menge an PD-L1 noch in der Anordnung in Clustern. (Abbildung 3.16)

Bei der mikroskopischen Untersuchung des T-Zell-Rezeptors konnte ebenso kein Unterschied in Konzentration oder Expressionsmuster zwischen verschiedenen T-Zellen oder Zeitpunkten festgemacht werden. MTOC, das während des T-Zell-Tumor-Kontakts zur Synapse hinbewegt wird, war in aktivierten T-Zellen in Abwesenheit von Tumorzellen genauso zentral lokalisiert, wie es in naiven Zellen der Fall ist.

3.2.4.2. Lokalisation von PD-1 während des Zellkontakts

Nachdem die Clusterung von PD-1 gezeigt werden konnte, war der nächste Schritt die Darstellung von PD-1 während des T-Zell-Tumor-Kontakts. Bei schwacher PD-1 Antikörper-Bindung und diffiziler Immunfluoreszenz-Färbung ermöglichten uns PD-1tg T-Zellen eine verbesserte mikroskopische Untersuchung. Dabei wurden diejenigen T-Zellen, die im physischen Kontakt mit Tumorzellen standen und den MTOC zur Kontaktstelle bewegt hatten, also den „Kiss of Death“ formten, bezüglich weiterer Protein-Muster analysiert.

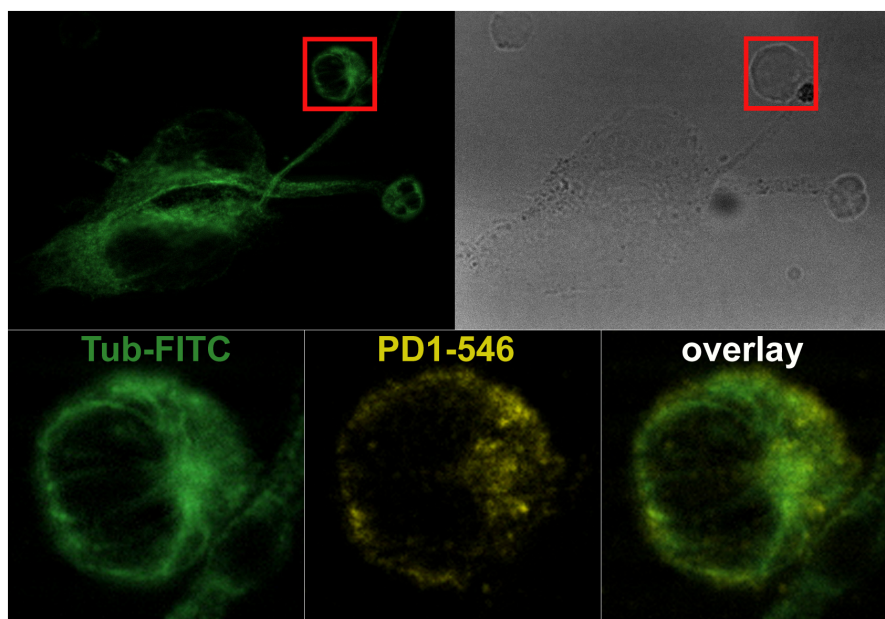


Abbildung 3.17.: Immunfluoreszenz - PD-1 und Tubulin: 2C TCRtg T-Zellen wurden mit B16.SIY.IFN kokultiviert und mit anti-PD-1- und anti-Tubulin-Antikörpern gefärbt. Während der T-Zell-Tumor-Interaktion wird simultan zur Polarisierung des MTOC an der Kontaktstelle zu einem Tumorausläufer PD-1 in der Nähe des MTOC konzentriert.

Bei der Mehrheit der Konjugate, bei denen sowohl MTOC als auch PD-1 erfolgreich gebunden war, zeigte sich eine räumliche Nähe mit Polarisierung von PD-1 in Richtung der immunologischen Synapse. (Abbildungen 3.17, 3.18)

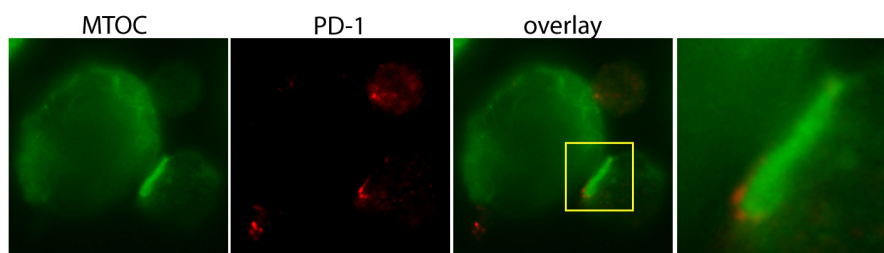


Abbildung 3.18.: Immunfluoreszenz - PD-1 und Tubulin: 2C TCRtg T-Zellen wurden mit B16.SIY.IFN kokultiviert und mit anti-PD-1- und anti-Tubulin-Antikörpern gefärbt. PD-1-Signale sind besonders an der Kontaktstelle zwischen Lymphozyt und Tumorzelle in direkter Nähe des MTOC zu beobachten.

In Experimenten, in denen statt Tubulin der T-Zell-Rezeptor 2C oder das zum TCR gehörende CD3-Protein auf der Zelloberfläche gefärbt wurden, zeigte sich ein vergleichbares Verhalten von PD-1. PD-1 war analog zum TCR meist in konzentrierter Form an der Kontaktstelle zu finden. (Abbildungen 3.19, 3.20 und 3.21)

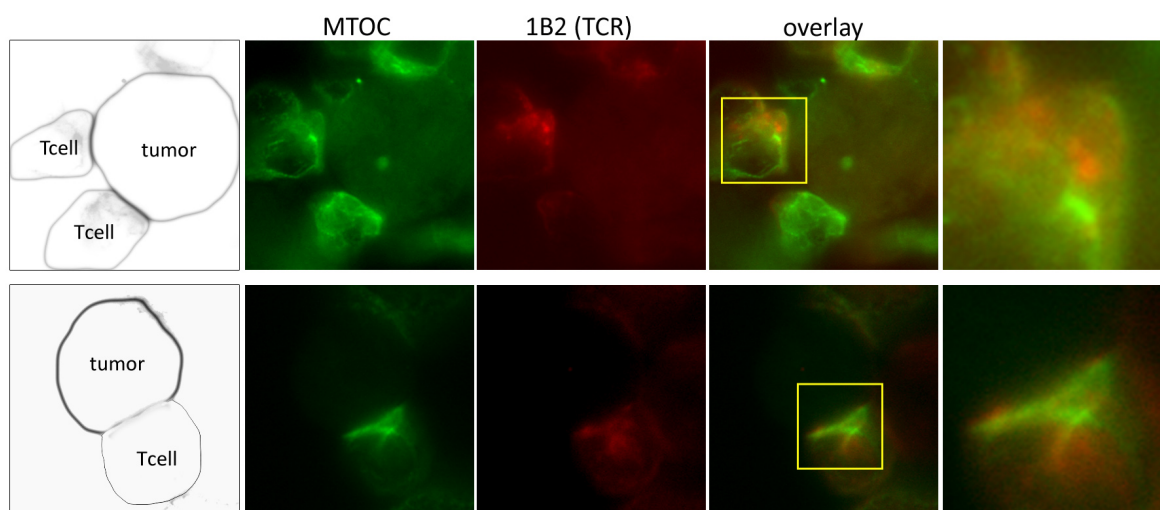


Abbildung 3.19.: Immunfluoreszenz - T-Zell-Rezeptor und Tubulin: 2C TCRtg T-Zellen wurden mit B16.SIY.IFN kokultiviert und mit anti-1B2- und anti-Tubulin-Antikörpern gefärbt. Bei der Formierung der Immunsynapse werden der T-Zell-Rezeptor und das MTOC an der Kontaktstelle polarisiert.

Um diese beiden Beobachtungen zu unterstützen, erfolgte die gleichzeitige Färbung von Tubulin und TCR, was erwartungsgemäß eine Kolo-kalisation des T-Zell-Rezeptors mit dem MTOC an der Synapse ergab.

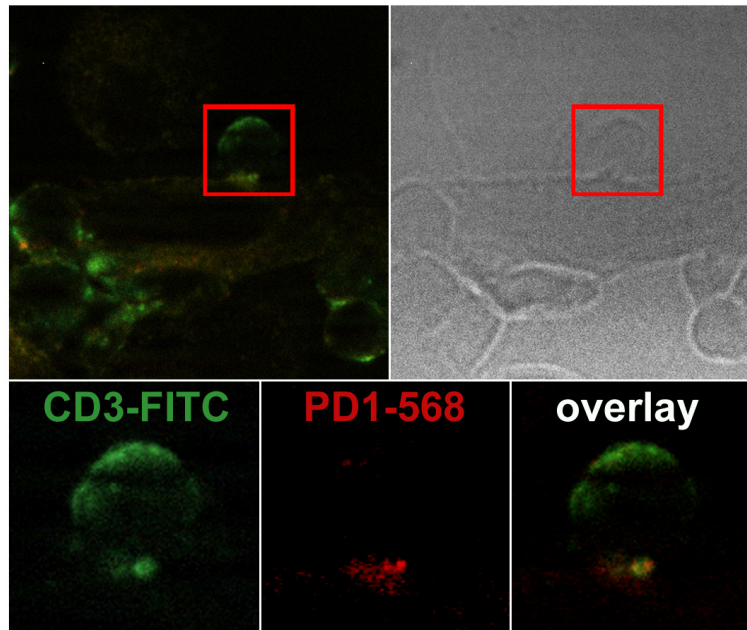


Abbildung 3.20.: Immunfluoreszenz - PD-1 und CD3: 2C TCRtg T-Zellen wurden mit B16.SIY.IFN kokultiviert und mit anti-PD-1- und anti-CD3-Antikörpern gefärbt. Während des T-Zell-Tumor-Kontaktes werden PD-1 und TCR (CD3) kolokalisiert.

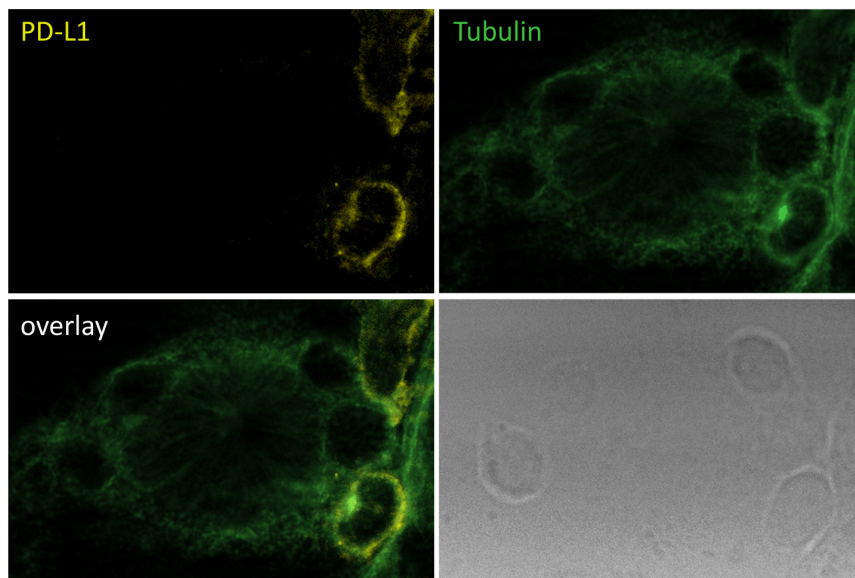


Abbildung 3.21.: Immunfluoreszenz - PD-L1 und Tubulin: 2C TCRtg T-Zellen wurden mit B16.SIY.IFN kokultiviert und mit anti-PD-L1- und anti-Tubulin-Antikörpern gefärbt. Das MTOC wird zur Bildung des „Kiss of Death“ an die Kontaktstelle bewegt, während PD-L1 in ubiquitärer Oberflächenexpression verharret.

Eine analoge Untersuchung von PD-L1 auf den T-Zellen während der Interaktion zwischen Lymphozyt und Tumorzelle zeigte, dass sich das Oberflächenexpressionsmuster

von PD-L1 im Gegensatz zu PD-1 nicht veränderte. Es erfolgte keine klare Polarisierung an der Synapse, sondern der Ligand blieb wie im naiven und im stimulierten Zustand über die gesamte Zelloberfläche verteilt.

3.2.4.3. B16 Melanomzellen ohne PD-L1-Polarisierung

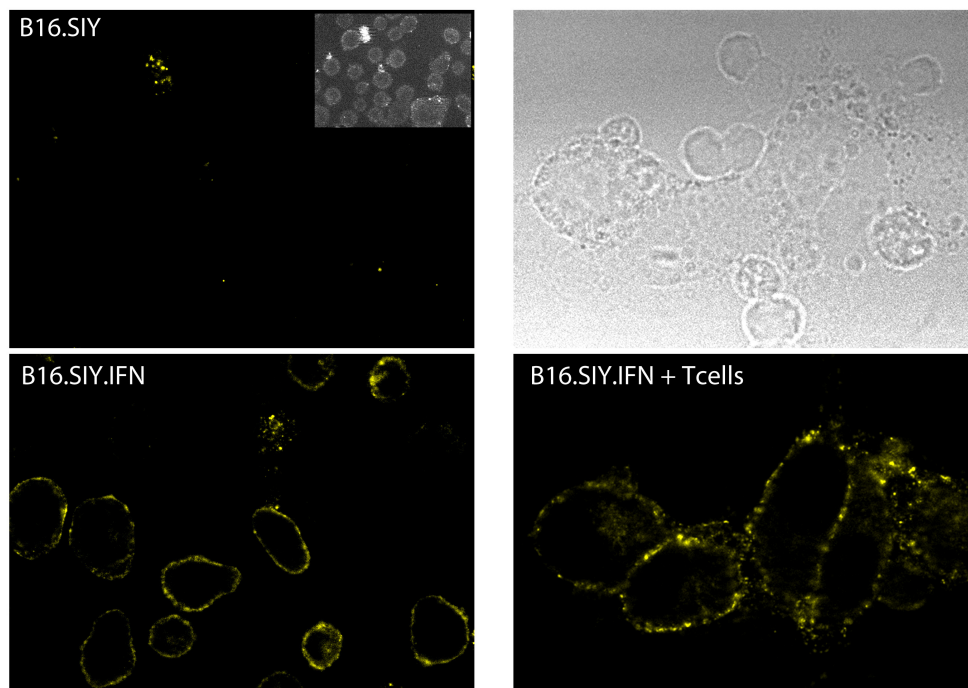


Abbildung 3.22.: Immunfluoreszenz - PD-L1 auf B16.SIY: B16.SIY-Tumorzellen wurden ohne (links oben) und nach IFN- γ -Exposition (links unten) mit anti-PD-L1-Antikörpern gefärbt. Entsprechend der FACS-Phänotypisierung fand sich nur nach IFN- γ -Exposition eine ubiquitäre PD-L1-Expression. Nach Kokultivierung mit 2C TCRtg T-Zellen zeigte sich keine Polarisierung von PD-L1 auf den Tumorzellen (rechte Spalte).

In unserem Modell führt die gleichzeitige Präsenz von PD-L1 auf Tumor und polarisiertem PD-1 auf Lymphozyt zur Hemmung der Immunantwort. Es war nun von Interesse, ob es auf den Tumorzellen zu PD-L1-Mobilisierung kommt, wenn sie mit der T-Zelle in Kontakt treten. Die Färbung und Analyse von T-Zell-Tumor-Konjugaten mit dem Augenmerk von PD-L1 auf den Tumorzellen zeigte jedoch keine Veränderung der PD-L1-Expression während der Interaktion. PD-L1 war unverändert geclustert und ohne klare Polarisierung angeordnet. Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie gab daher keinen Anhalt für einen aktiven, gesteuerten Gegenangriff der Tumorzelle. (Abbildung 3.22)

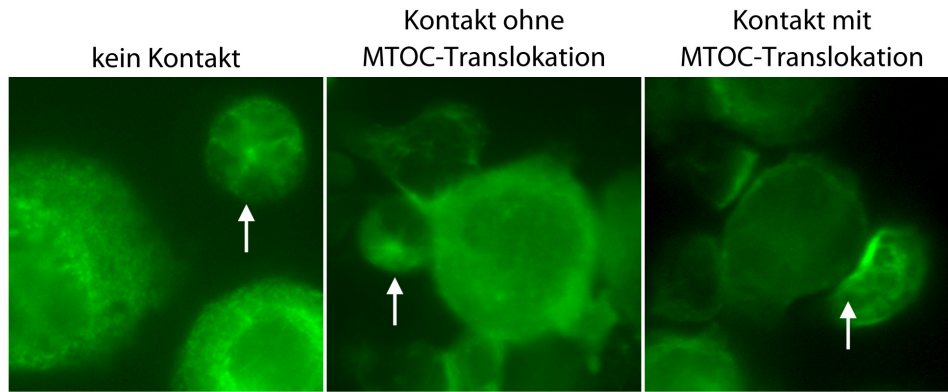


Abbildung 3.23.: Immunfluoreszenz - MTOC-Translokation: Kokulturen aus T-Zellen und Tumorzellen wurden mit anti-Tubulin-Antikörpern gefärbt. Zur statistischen Auswertung von lymphozytären MTOC-Translokationen erfolgte die Einteilung in T-Zellen ohne Kontakt zum Targettumor (links), T-Zellen mit Kontakt, jedoch ohne MTOC-Translokation (Mitte) und T-Zellen mit Kontakt und MTOC-Translokation zur Synapse (rechts).

3.2.5. Einfluss von PD-1 auf die Synapsenbildung

Erst die Ausbildung von Immunsynapsen ermöglicht die Effektorfunktionen von zytotoxischen Lymphozyten. Da diese durch PD-1-Präsenz deutlich eingeschränkt sind, verglichen wir die unterschiedlichen PD-1-Genotypen hinsichtlich der Konjugatbildung. Dabei kamen T-Zellen zum Einsatz, die entweder über 10 oder 20 Tage vorstimuliert worden waren.

Wir definierten für die mikroskopische Analyse drei Gruppen: 1) T-Zellen ohne physischen Kontakt zu einer Tumorzelle. 2) T-Zellen mit Kontakt zum Tumor, aber ohne Translokation des MTOC zur Immunsynapse. 3) T-Zellen mit Kontakt zum Tumor und mit Translokation des MTOC zur Immunsynapse. (Abbildung 3.23)

3.2.5.1. PD-1 ohne Einfluss auf Bildung von T-Zell-Tumor-Konjugaten

Die Auszählung der Konjugate ergab, dass nach 10 Tagen Vorstimulation keine signifikanten Unterschiede zwischen den T-Zell-Gruppen erkennbar waren: unabhängig von der An- oder Abwesenheit von PD-1 war der Prozentsatz von T-Zell-Tumor-Kontakten vergleichbar hoch. Das gleiche Ergebnis war nach 20-tägiger Stimulation zu beobachten. Jedoch war der Anteil an Zellkontakten nach 20 Tagen, über alle T-Zell-Gruppen, deutlich geringer als nach 10 Tagen. (Abbildung 3.24)

Im nächsten Schritt wurden die T-Zell-Tumorzell-Konjugate unterteilt in eine Gruppe an Konjugaten mit erfolgter MTOC-Translokation zur Immunsynapse und eine Gruppe ohne eben diese Translokation. Der Vergleich der unterschiedlichen PD-1-Genotypen zeigte

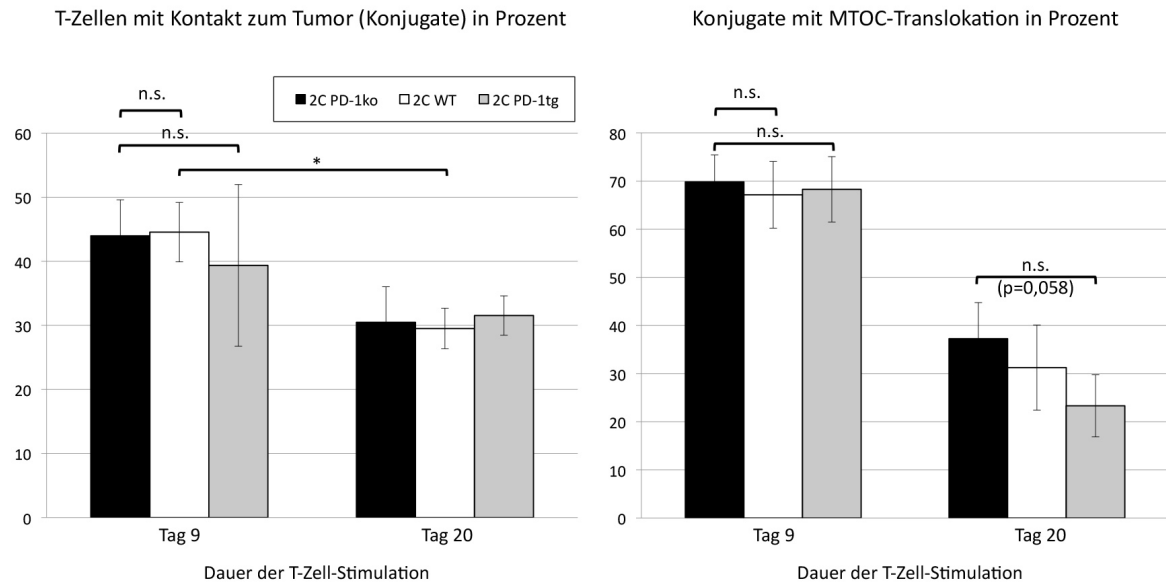


Abbildung 3.24.: Einfluss von PD-1 auf Konjugatbildung und MTOC-Translokation: 9 Tage (=2 Runden) bzw. 20 Tage (=4 Runden) stimulierte T-Zellen wurden mit B16.SIY.IFN-Tumorzellen kokultiviert und nach Tubulin-Färbung die Konjugatbildung bzw. MTOC-Translokation mikroskopisch erfasst. T-Zellen zeigen weder nach 9 noch nach 20 Tagen Stimulation einen PD-1 vermittelten Unterschied bei der Fähigkeit, Konjugate mit Ziel-Tumorzellen zu bilden. Während 9 Tage stimulierte T-Zellen ebenso keinen PD-1 abhängigen Unterschied in der Frequenz an MTOC-Translokationen in Richtung Synapse zeigen, ist nach 20 Tagen eine geringgradig höhere MTOC-Reorientierungsbereitschaft in PD-1 defizienten T-Zellen zu sehen, mit der Tendenz zur Signifikanz zwischen PD-1ko und PD-1tg T-Zellen ($p=0,58$).

bei aktiven, 10 Tage stimulierten T-Zellen hinsichtlich des Anteils erfolgter MTOC-Translokationen in den Lymphozyten keinen signifikanten Unterschied. Bei T-Zellen hingegen, die 20 Tage lang stimuliert worden waren, zeigte sich generell ein niedrigerer Prozentsatz an MTOC-Polarisierung als bei den kürzer stimulierten Zellen. Andererseits ließ sich eine, wenn auch nicht signifikante, so doch bemerkenswerte Tendenz in Richtung PD-1-Abhängigkeit feststellen. PD-1ko T-Zellen konnten etwas mehr MTOC-Reorientierungen an der Kontaktstelle aufweisen, als Wildtyp T-Zellen oder die noch weniger polarisierten PD-1tg Lymphozyten.

3.2.5.2. Effektivere Polarisierung von Granzym bei PD-1-Absenz

Der Ausbildung der Immunsynapse und der MTOC-Polarisierung folgt der Transport und die Ausschüttung zytotoxischer Substanzen. Die Zytotoxizitätsassays hatten bereits die PD-1-abhängige Inhibition bewiesen. Eine Aussage über die auch effektive Polarisierung der zytotoxischen Granula an der Synapse war noch nicht möglich. Daher färbten

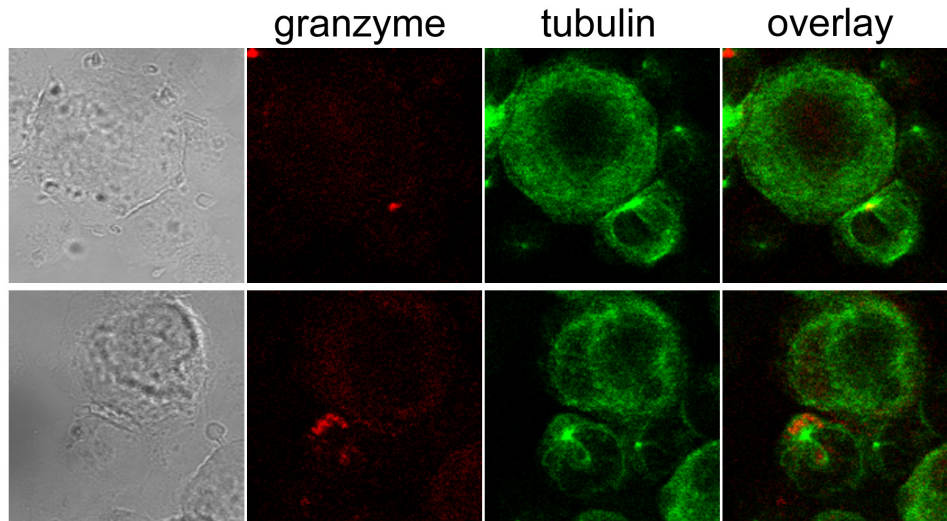


Abbildung 3.25.: Immunfluoreszenz - Granzym-Polarisierung: T-Zellen in Kokultur mit Tumorzellen wurden für intrazelluläres Granzym B und Tubulin gefärbt. Granzym kolokalisiert während des „Kiss of Death“ mit dem MTOC der T-Zelle.

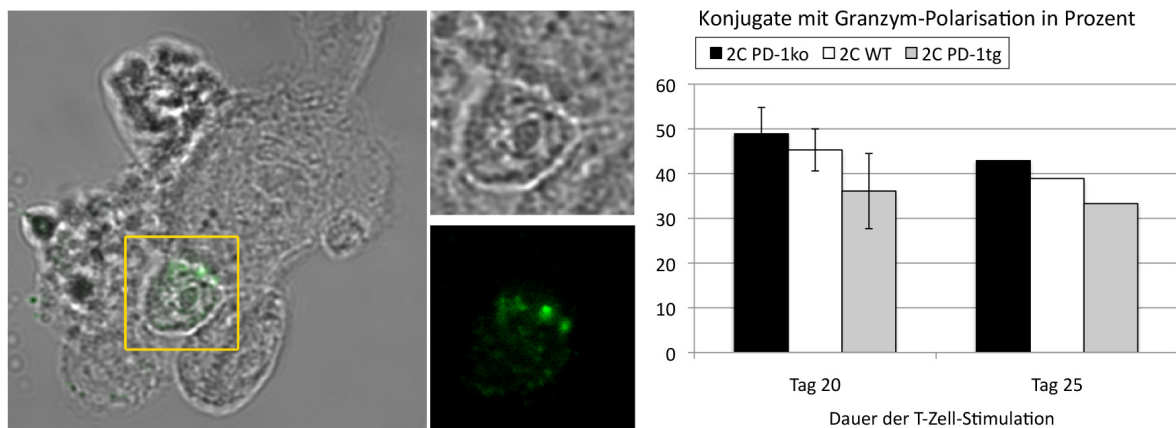


Abbildung 3.26.: Immunfluoreszenz - Granzym-Polarisierung. Links: T-Zellen in Kokultur mit Tumorzellen wurden für intrazelluläres Granzym B gefärbt. Granzym polarisiert als lytisches Protein während des „Kiss of Death“ an der Immunsynapse. Rechts: In T-Zell-Tumor-Konjugaten mit positiven Granzym-Färbungen zeigen PD-1 defiziente T-Zellen tendenziell, jedoch nicht signifikant eine höhere Polarisation von Granzym in Richtung der Tumorzelle als Wildtyp- oder PD-1 überexprimierende Lymphozyten.

wir in T-Zell-Tumor-Konjugaten das zytotoxische Substrat Granzym B sowie Tubulin und verglichen die T-Zell-Gruppen hinsichtlich der Granzym-Polarisierung. Wie bei der MTOC-Bewegung ergab sich kein signifikanter Unterschied, jedoch eine Tendenz zu einer PD-1 vermittelten Hemmung der Granzym-Polarisierung. (Abbildungen 3.25, 3.26)

4. Diskussion

4.1. Sterische Inhibition des Beadcoatings durch PD-L1.Ig

Zahlreiche Tumore haben die Fähigkeit, dem Immunsystem zu entgehen, unter anderem weil tumor-infiltrierende Lymphozyten oftmals anerg sind und keine Zytokine produzieren können. Zudem sind sie nicht in der Lage, zytotoxische Granula an der Kontaktstelle zum Tumor zu polarisieren. [133] Ein wichtiger Rezeptor bei der Vermittlung von Toleranz, auch gegenüber Tumoren, ist PD-1 auf Lymphozyten. Die Bindung mit seinem Liganden PD-L1 resultiert in der Hemmung der T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion. [55]

Bennett et al. hatten mittels Antikörper- bzw. Ig-beladenen Beads gezeigt, dass nur die CIS-Konfiguration, also Beads mit gleichzeitiger Beladung von PD-L1 und anti-CD3, die Lymphozyten-Aktivierung unterbinden kann. Die TRANS-Konfiguration hingegen, wo PD-L1 und anti-CD3 auf getrennten Beads angeboten wurden, führte zur normalen Lymphozyten-Aktivierung. Daher wurde postuliert, dass – aufgrund der Notwendigkeit der unmittelbaren Nähe von PD-L1 und anti-CD3, also von PD-1-Ligand und T-Zell-Rezeptor-Ligand für die erfolgreiche T-Zell-Hemmung – auch die entsprechenden Rezeptoren in direkter Ortsbeziehung zueinander stehen müssen, um in einer effektiven TCR-Signal-Hemmung zu resultieren. [11] Was jedoch in der Veröffentlichung einerseits nicht gezeigt worden war, war der Beweis der Methodik, also der Beweis der erfolgreichen Bead-Beladung mit den notwendigen Proteinen. Und andererseits hatte auch keine Negativ-Kontrolle stattgefunden, zum Beispiel anhand PD-1 defizienter T-Zellen.

Um also die Hypothese der notwendigen Koloalisation von TCR und PD-1 für die effektive Inhibition zu stützen, wurde in unserem Labor das gleiche Setting angewandt, erweitert um PD-1 defiziente Lymphozyten als Negativ-Kontrolle. Da diese T-Zellen keinen Rezeptor für das inhibitorische Signal des PD-1-Liganden besitzen, war für diese Zellen eine ungehemmte T-Zell-Aktivierung zu erwarten, im Gegensatz zu den normogenen Lymphozyten, bei denen entsprechend der Daten von Bennett reduzierte Zytokin-Spiegel

anzunehmen waren. Es zeigte sich hingegen, dass Beads, die sowohl mittels anti-CD3 den TCR-Stimulus als auch mittels PD-L1.Ig den inhibitorischen Liganden für PD-1 lieferten, beide Zellstämme in ihrer Zytokinproduktion hemmten. Die Abwesenheit des inhibitorischen Rezeptors schützte also nicht vor einer reduzierten T-Zell-Funktionalität. Da die PD-1-Expression bzw. -Abwesenheit anhand durchflusszytometrischer PD-1-Phänotypisierung bewiesen war, kamen für die reduzierte T-Zell-Stimulation trotz PD-1-Defizienz zwei Möglichkeiten in Betracht: Entweder vermittelt PD-L1 auf den Beads seine inhibitorische Signalwirkung über einen zweiten Rezeptor neben PD-1, der bis dato nicht bekannt war, der auf den PD-1-genmodifizierten Lymphozyten weiterhin exprimiert wird und inhibitorische Signale weiterleitet. Oder die Ursache für die verminderte T-Zell-Aktivierung liegt nicht in einer aktiven Inhibition, sondern in einem Mangel an Stimuli bzw. einem technischen Mangel des Experimenten-Setups. Die effektive T-Zell-Stimulation durch anti-CD3 alleine oder in Anwesenheit des Kontroll-Igs – jedoch ohne PD-L1 – wirkte als „proof of principle“ im Sinne einer Positiv-Kontrolle. Tatsächlich zeigte die FACS-Analyse der Beads, dass die Beschichtung von anti-CD3/28-Antikörpern in Anwesenheit von PD-L1.Ig niedrigere Konzentrationen erreichte, als sie durch Beschichtung der Antikörper alleine oder in Anwesenheit von einem Kontroll-Immunglobulin möglich waren. Der Effekt war abhängig von der Reihenfolge der Beschichtungsprozeduren sowie von der Konzentration von PD-L1.Ig. Eine ähnliche Verdrängung von anti-CD3/28-Antikörpern war bei übermäßigen Konzentrationen des Kontroll-Immunglobulins in der Titration simulierbar.

Daraus lässt sich folgern, dass es beim Beschichtungsvorgang zu einer sterischen Verdrängung der anti-CD3/28-Antikörper kommt. Der Verdrängungseffekt ist bei PD-L1.Ig bereits bei niedrigeren Konzentrationen als beim Kontroll-Ig zu beobachten, was auf eine höhere Affinität zu den Beads oder auf eine ausladendere räumliche Struktur schließen lässt. Die entsprechende molekulare Analyse von PD-L1.Ig und Isotyp.Ig könnte hier in zukünftigen Untersuchungen Klarheit schaffen. Ähnliche Einflüsse sind nach Literaturrecherche unseres Wissens nicht beschrieben, jedoch gibt auch der Hersteller die Möglichkeit von Spacer-Molekülen an, die wahrscheinlich durch niedrigere molekulare Größenkonformation eine engere Beschichtung der Bead-Oberflächen erlauben.

Zusammengefasst konnten wir beweisen, dass die Daten von Bennett bezüglich der PD-1-Lokalisation anhand von Bead-Experimenten nicht auf einem validen Setting basierten. Die verminderte T-Zell-Funktion in diesem Versuchsaufbau ist alleine auf eine insuffiziente Stimulation zurückzuführen, die durch eine sterische Bindungsinhibition in Anwesenheit von PD-L1.Ig bedingt ist. Die alternative Lösungsidee, dass ein anderer Rezeptor

für PD-L1 neben PD-1 verantwortlich für die verminderte Funktionalität der PD-1 defizienten T-Zellen zeichnet – wenn das auch in diesem Fall nicht die Ursache war –, erfuhr kurz nach unseren Experimenten neue Aufmerksamkeit: Freeman et al. konnten die Identifizierung eines zweiten Rezeptors für PD-L1, nämlich B7-1, zeigen. [24] Auch wenn die Signalwirkung PD-L1/B7-1 ausführlich in einer Reihe von Experimenten bewiesen wurde, ist interessanterweise auch in dieser Veröffentlichung das oben genannte Bead-Setting genutzt worden, mit dem Ergebnis, dass PD-L1.Ig in PD-1ko T-Zellen zur Inhibition führt. Auch dieser Teil der Arbeit von Butte ist also kritisch zu sehen, da eine Verifizierung der Beadcoating-Effizienz nicht geliefert wurde. In unseren Experimenten kann hingegen ein Bias durch B7 ausgeschlossen werden, da kein B7 auf den eingesetzten Tumorzellen exprimiert wird.

4.2. Exhaustion bei repetitiver Stimulation

Da oben genanntes Setting von Bennett keine validen Rückschlüsse erlaubte, stellte sich erneut die Frage, wie die räumliche Anordnung von PD-1 und dem TCR zu beantworten sei. Wir verzichteten hierfür auf weitere Bead-Analysen und entschieden uns für ein murines Modell. Ein TCR-transgenes Modell wurde gewählt, da dadurch die Variabilität polyklonaler TCR minimiert werden konnte. Neben den bereits zuvor erprobten PD-1 defizienten und Wildtyp Mäusen wurde eine dritte PD-1 genmodifizierte Gruppe eingeschlossen: PD-1 überexprimierende T-Zellen. Dies sollte die genauere Beurteilung des Einfluss von PD-1 während der T-Zell-Tumor-Interaktion erlauben.

Zunächst stellte sich die Frage, ob und wie sich die PD-1 Expression in unserem Modell unter optimalen Aktivierungsbedingungen auswirkte.

Die T-Zellen wurden mit der Tumorzelllinie p815.B7-1 stimuliert, die mit dem endogenen p2CA Peptid auf allogenem Ld-MHC-Kontext den TCR-Stimulus sowie mit CD80 (B7-1) als Ligand für CD28 den Kostimulus anboten. Daneben exprimierte p815.B7-1 konstitutiv PD-L1. Im Vergleich der drei PD-1 Gruppen hinsichtlich der Expansionsraten zeigte sich jedoch kein Unterschied. Der initiale Stimulationserfolg war ebenso wie der Verlust der Proliferationsfähigkeit nach repetitiver Tumorexposition unabhängig von PD-1.

Tumor-reaktive T-Zellen sind bei hoher Tumorantigen-Dichte den virus-spezifischen T-Zellen in chronischen Infektionen phänotypisch ähnlich: beide unterliegen einer Aufregulierung von inhibitorischen Molekülen und einer Herabregulierung von Zytokinrezeptoren. Außerdem kommt es zum Funktionsverlust z.B. bei der Zytokinproduktion. Unter

den inhibitorischen Molekülen ist auch hier besonders PD-1 zu nennen. [89, 110] Virus-spezifische T-Zellen in Exhaustion bei chronischen Infektionen waren hinsichtlich der Genexpression im Vergleich zu Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen nach akuter Infektion durch Ahmed et. al untersucht worden [170]: Hohe Expressionsmuster von PD-1 auf virus-spezifischen T-Zellen in chronischen Infektionen korrelierten mit funktioneller „Exhaustion“. Antikörper-vermittelte B7-H1 Blockade während der chronischen Virusinfektion konnte allerdings die Proliferation, Zytokin-Produktion und Zell-Lyse wieder herstellen. [9]

Bei den Wildtyp-Lymphozyten korrelierte die beobachtete Aufregulierung von PD-1 auf der Oberfläche dem von Ahmed beschriebenen Phänotyp der erschöpften T-Zellen. [89] Die gen-defizienten bzw. PD-1 überexprimierenden T-Zell-Reihen wiesen hingegen – gemäß ihrem Genotyp – keine Veränderung der PD-1-Expression auf. Anhand der Daten von Ahmed et al., die durch eine antikörper-vermittelte Blockade des PD-1/PD-L1 Signalwegs eine Verbesserung der T-Zell-Funktionalität nach „Exhaustion“ bewirkten, wäre jedoch zu erwarten gewesen, dass PD-1-defiziente T-Zellen eine geringere oder verspätete Ausprägung der Lymphozyten-„Exhaustion“, also auch nach mehreren Stimulationsrunden noch normal-hohe Proliferationszahlen zeigen. Stattdessen führte die wiederholte Stimulation gleichermaßen zu reduzierter Proliferationskapazität.

Der fehlende Einfluss der PD-1 Expression ist vereinbar mit dem Wissen, dass die T-Zell-Hemmung durch PD-1 durch ausreichende aktivierende Stimuli wie z.B. mittels Interaktion von B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) mit CD28 durchbrochen werden kann. [2, 11] Entsprechend kann der PD-1/PD-L1 Signalweg in unserem Modell mit 2C TCR tg T-Zellen und p815.B7-1 Tumorzellen aufgrund der dominierenden CD80/CD28 Kostimulation weder in PD-1 Wildtyp- noch in Über-Expression seine inhibitorische Wirkung entfalten. CD80 auf Tumorzellen, das die Suppression durch PD-L1 aufhebt, eröffnet auch therapeutische Möglichkeiten: Haile et al. zeigten, dass Tumorzellen, die CD80 durch Gentransfektion exprimierten, nicht via PD-L1 immuninhibierend wirken können. [68]

Von Kaiser et al. konnte in weiteren Experimenten die Beobachtung bestätigt werden, dass T-Zellen bei repetitiver Stimulation nach initial hoher Expansionsraten die Fähigkeit zur Proliferation im Verlauf verlieren. Während im Fall von p815.B7-1 die Präsenz des Kostimulus entscheidend für den fehlenden Einfluss von PD-1 ist, zeigte sich bei anderen Tumormodellen, dass die Inhibition durch den PD-1/PD-L1-Signalweg sowohl von dem Grad der Exhaustion als auch von der Antigen-Dichte auf den Zieltumorzellen abhängig ist. [82] Ausgeprägtere Exhaustion und niedrigere Antigenkonzentration

resultiert in höherer Suszeptibilität für die PD-1-vermittelte Inhibition. Dass die Proliferationszahlen im p815.B7-1 Setting also nicht abhängig von der PD-1-Expression der T-Zellen ist, lässt sich demnach auch auf die hohe Antigendichte von p2CA auf den p815.B7-1-Tumorzellen zurückführen.

Die Inhibition aller drei T-Zell-Reihen bei der Interaktion von 2C TCRtg T-Zellen und p815.B7-1 Tumorzellen könnte daneben dem zweiten Rezeptor für PD-L1, nämlich CD80 auf Lymphozyten, geschuldet sein. Die Induktion durch eine zu geringe T-Zell-Stimulation ist aufgrund der Spezifität des 2C T-Zell-Rezeptors zum Antigen des Tumors und der Kostimulation mit CD80 ausgeschlossen, die Zwei-Signal-Hypothese in diesem Modell somit erfüllt.

Der Phänotyp im Bezug auf CD25 oder IL-7R α von restimulierten 2C TCRtg T-Zellen in unserem Modell wurde bislang nicht erhoben. PD-1⁺ CD8⁺ tumor-infiltrierende Zellen exprimierten bei Rosenberg et al. diese Moleküle nicht und waren damit unfähig, zu proliferieren, Effektor-Zytokine zu produzieren und in Gedächtniszellen zu differenzieren. [7, 89]

Es ist festzuhalten, dass die Exhaustion, die 2C TCR tg T-Zellen nach wiederholter Stimulation mit p815.B7-1 entwickeln, unabhängig von PD-1 ist, da sowohl Antigendichte als auch Angebot von B7-1 als Kostimulus die PD-1-Inhibition überkommen. Dass trotz Erfüllung der Zwei-Signal-Hypothese es im Verlauf der repetitiven Stimulation zu Exhaustion überhaupt kommt, liegt an genetischen Alterungsprozessen der Zellen. Deren Unabhängigkeit von PD-1 wurde ebenfalls von Kaiser et al. gezeigt. [82]

4.3. PD-1 vermittelte Inhibition der Effektorfunktionen

Da Tumore in natura selten die Zwei-Signal-Hypothese erfüllen, kam nach der optimalen T-Zell-Aktivierung mit p815.B7-1 die Melanom-Zellreihe B16.SIY zum Einsatz, die zwar mit dem SIY-Peptid im Kb-Kontext einen spezifischen TCR-Stimulus, jedoch keinen Kostimulus vermittelt. Zunächst musste eine Charakterisierung der T-Zell-Funktionalität bei Exposition der T-Zellen mit eben diesem Tumorziel erfolgen, um anhand der unterschiedlichen PD-1-Genotypen die Wirkung von PD-1 auf die TCR-Signal-Aktivierung im 2C Modell zu beurteilen.

Es zeigte sich, dass im Vergleich zu Wildtyp 2C Zellen die Abwesenheit von PD-1 eine verbesserte Effektorfunktionalität der CD8⁺ Lymphozyten im Bezug auf Proliferation, Zytokinproduktion und lytischer Aktivität zur Folge hatte. Der Einfluss von PD-1 wurde

unterstrichen durch die Beobachtung an T-Zellen mit PD-1 Überexpression, die im Vergleich zu Wildtyp-Zellen deutlich gehemmter in ihrer Funktionalität waren. In unserem Modell ist also die Inhibition via PD-1 bei Fehlen eines anderweitigen B7-Stimulus entscheidend für die T-Zell-Aktivierung und eine niedrigere oder fehlende PD-1 Expression resultiert in verbesserter T-Zell-Funktionalität.

Diese verbesserte Tumorattacke bei fehlender PD-1-Signalisierung passt zu den Daten von Probst, dass die Gen-Defizienz bzw. Abwesenheit von PD-1 zur verstärkten Aktivierung statt zur Toleranzinduktion führt. [129] Zwar kann diese Überaktivierung Autoimmun-Erkrankungen verursachen [118, 135, 168], jedoch ermöglicht dies auch eine verbesserte Immunkontrolle von Viruserkrankungen und eine effektivere Tumorabstoßung samt verringerter Metastasierung durch PD-1-Defizienz auf virus- bzw. tumorspezifischen T-Zellen. [15, 79, 78]

Wie Butte et al. beschrieben haben, sind Signale, die durch CD80 oder PD-L1 vermittelt werden, inhibitorischer Natur und können in verminderter Expression von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche sowie zu verringerter Lymphozyten-Proliferation und gehemmter Zytokinproduktion führen. [24] PD-L1 als auch CD80 werden auf T-Zellen, B-Zellen, DCs und Makrophagen exprimiert.

Daher stellte sich die Frage, ob bei der Kokultivierung von 2C TCRtg T-Zellen und B16.SIY Tumorzellen nicht nur tumoröses PD-L1 einen Effekt hat. Schließlich exprimieren Lymphozyten ebenfalls PD-L1 und im experimentellen *in vitro* Setting war ein additiver interlymphozytärer Effekt durch PD-L1- bzw. CD80-Signale denkbar. Dies konnten wir jedoch dadurch ausschließen, dass neben der Exposition von 2C T-Zellen mit B16.SIY Tumorzellen noch als dritte Zelleinheit CD8⁺ Lymphozyten zugegeben wurden, die entweder gendefizient für PD-L1 oder diesbezüglich unmodifiziert waren. Sollte lymphozytäres PD-L1 also einen inhibitorischen Einfluss auf andere T-Zellen haben, wäre zu erwarten gewesen, dass die Zytokin-Produktion in den Ansätzen mit PD-L1 exprimierenden Wildtyp-Lymphozyten niedriger wäre als in Ansätzen, in denen kein PD-L1 auf den Bystander Lymphozyten exprimiert wird. Abwesenheit von PD-L1 auf antigen-unspezifischen syngen CD8⁺ Lymphozyten in der Kokultur zeigte jedoch kein unterschiedliches Ergebnis im Vergleich zu PD-L1⁺ syngen CD8⁺ T-Zellen.

Liganden für PD-1 haben als Signalgeber mit immuninhibitorischer Funktion breites Interesse hervorgerufen: Untersuchungen mit PD-L1 defizienten Mäusen hatten aufgezeigt, dass dieser Ligand CD8⁺ T-Zellen negativ reguliert. [43, 102] Für PD-L2 gibt es anhand unterschiedlicher Mausmodelle mit PD-L2-Defizienz sowohl die Beobachtung, dass PD-L2 eine positive als auch eine negative kostimulatorische Funktion besitzt. [147, 177]

Aufgrund höherer Rezeptor-Affinität ist PD-L2 im Vergleich zu PD-L1 besser geeignet, PD-1 zur Synapse hin zu rekrutieren. [175] Die Inhibition der T-Zell-Aktivierung lässt sich also in Modellen, in denen hohe Oberflächenkonzentrationen von PD-L2 vorkommen, besser darstellen. [127] In einer Umgebung mit niedriger oder keiner PD-L2 Expression, ist hingegen PD-L1 ausschlaggebend für die T-Zell-Hemmung. PD-L2 findet sich weder auf B16.SIY Tumorzellen noch auf T-Zellen, sondern ist induzierbar auf DCs, Makrophagen und Stammzellen aus dem Knochenmark (= Bonemarrow derived stem cells). [24, 54] CD80, also der zweite Rezeptor für PD-L1 findet sich unter anderem auf T-Zellen, B-Zellen und Monozyten.

Jedoch muss festgestellt werden, dass zu der Rolle von PD-L1 auf Lymphozyten, speziell auf CD8⁺ T-Zellen, bislang wenig bekannt ist. Die Expression legt eine bidirektionale Signalwirkung zwischen diesen Oberflächenmolekülen dieser Zellarten nahe. Butte et al, die B7-1 als zweiten Rezeptor für PD-L1 erstmalig beschrieben, postulierten aufgrund der Bindungsstärke und der beobachteten Funktionsreduktion bei Abwesenheit von PD-L1 auf T-Zellen, dass auch B7-1 auf antigen-präsentierenden Zellen als inhibitorischer Ligand mit PD-L1 als dessen Rezeptor einwirken könnte. [24] Und ebenso könne PD-L1 auf T-Zellen inhibitorische Signale über B7-1 aussenden. Der tatsächliche Effekt *in vivo* ist hierbei allerdings offen. [34] Pulko et al. konnten zeigen, dass B7-H1 auf aktivierten CD8⁺ T-Zellen hilft, das Überleben nach Antigen-Stimulation sowie die Effektorfunktion zu optimieren und dass PD-L1 defiziente T-Zellen Tumorstadium nicht supprimieren konnten. [131] In Modellen mit T-Zell-Exhaustion bei chronischen viralen Infektionen konnte eine Wiederherstellung der Effektorfunktionen durch PD-L1 Antikörper beobachtet werden [38, 56]. Bei Butte et al. fand sich in eben diesen chronischen Virus-Modellen ein besserer Effekt bei PD-L1- als bei PD-1-Antikörpern. [24] In Zusammenschau der Untersuchungen ist zu diskutieren, ob diese Wiederherstellung der T-Zell-Funktionalität Folge der Blockade durch die Antikörper, die die inhibitorische Wirkung der PD-L1/PD-1-Interaktion verhindern, oder Folge der PD-L1-Bindung auf T-Zellen im Sinne eines positiven Rezeptorsignals, ist. In unserem Modell zeigt sich zumindest kein signifikanter Unterschied der tumorspezifischen T-Zellen in Abhängigkeit der PD-L1-Präsenz auf Bystander T-Zellen. Der nächste Schritt in unserem Modell wäre somit, PD-1/PD-L1 doppel-defiziente T-Zellen zu generieren und das Funktionalitätspotential zu evaluieren. PD-L1 wird auf Monozyten exprimiert, und damit auch auf inhibitorisch wirksamen Zellen wie regulatorischen T-Zellen. Dendritische Zellen mit PD-L1 Gendefizienz führten zu gesteigerter Zytokinproduktion, was möglicherweise als inhibitorischer Signalverlust über zwei Rezeptoren, nämlich über PD-1 sowie B7-1 diskutiert wurde. [127] Wie wirkt

jedoch PD-L1, das von Lymphozyten exprimiert wird? Hat in Lymphozyten die Tatsache, dass neben PD-L1 kein zusätzliches Antigen präsentiert wird, einen Effekt auf die PD-L1-Funktion? Die Rolle von PD-L1 auf Lymphozyten bedarf also noch weiterer Analysen, unter anderem mit Hilfe von gendefizienten Modellen, um dessen lymphozytäre Rolle klarer zu charakterisieren.

Zusammengefasst konnte hier die inhibitorische Wirkung von PD-1 bei suffizienter T-Zell-Aktivierung in unserem Modell bewiesen und ein lymphozytärer PD-L1 Bystander Effekt ausgeschlossen werden. Hier ist zu beachten, dass in unserem Setting PD-L1 keine Veränderung des Expressionslevels erfuhr, sondern stets präsent war, unabhängig von der PD-1-Genetik.

4.4. PD-1 in Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Nachdem wir zeigen konnten, dass die Lokalisationsanalyse von PD-1 mittels Beads nicht valide war und dass unser Modell mit TCR-transgenen T-Zellen und dazu passenden Zieltumoren die Beurteilung des PD-1-Einfluss auf die T-Zell-Funktionalität erlaubt, war die nächste Frage, wie sich PD-1 intrazellulär bzw. auf der Zelloberfläche in Abhängigkeit des Aktivierungszustands verhält. Insbesondere sollte die Theorie von Bennett über die Kolo-kalisation von PD-1 und TCR während der T-Zell-Aktivierung geprüft werden. Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie erlaubte darüber hinaus die Beobachtung von PD-1 während der T-Zell-Tumor-Interaktion.

In unseren Messungen fand sich PD-1 intrazellulär sowohl in naiven wie in aktivierten CD8⁺ T-Zellen diffus verteilt, ohne klare Abgrenzbarkeit in unterschiedliche Kompartimente. PD-1 auf der Oberfläche wurde im nativen Zustand ausschließlich auf PD-1tg Zellen diffus exprimiert, während nach Zellaktivierung eine in Clustern akkumulierte Expression auf Wildtyp- und PD-1tg-Zellen festzustellen war. Bei der Darstellung der T-Zell-Tumor-Interaktion zeigte sich eine Polarisierung von PD-1 auf den T-Zellen in Richtung der Kontaktstelle, während PD-L1 auf T-Zellen unverändert ubiquitär exprimiert wurde.

Zentrales Problem der Immunfluoreszenz-Technik sind falsch-positive oder auch falsch-negative Signale. PD-1 defiziente T-Zellen, deren Zellmembran nach Fixierung permeabilisiert ist, lieferte PD-1 positive Signale. Dass PD-1 intrazellulär auch in PD-1ko T-Zellen nachweisbar ist, ist damit erklärt, dass bei der Genmodifikation die Transmembran-Domäne exkludiert wurde, PD-1 also weiter transduziert, jedoch nicht exprimiert werden kann. [115, 116] Die ubiquitäre Anfärbbarkeit von PD-1 im Zytosol verhinderte die Be-

urteilung der Oberflächenverteilung. Lebende PD-1ko T-Zellen, bei denen die Zellwand impermeabel ist, das Zytosol von Antikörpern nicht erreicht wird und somit lediglich die Zelloberfläche eine Antikörper-Färbung erfährt, konnten als Negativkontrolle ohne Immunfluoreszenz-Signal für PD-1 validiert werden. Da jedoch auch aktivierte PD-1-exprimierende Wildtyp-Zellen trotz guter Nachweisbarkeit in der Durchflusszytometrie ein schwaches Signal für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie lieferten, erfolgte die Analyse von PD-1 auf PD-1tg T-Zellen.

Pentcheva-Hoang und die Gruppe um Allison hatte mittels Immunfluoreszenz die Lokalisation von PD-1 in aktivierten CD4⁺ T-Zellen und während des Kontakts mit DCs untersucht. Im Gegensatz zu unseren Mikroskopie-Ergebnissen, konnte ebenda PD-1 in intrazellulären Kompartimenten, in der Nähe des Golgi-Netzwerks und an der Plasmamembran nachgewiesen werden. Wiederaufnehmende Endosomen konnten hingegen nicht mit PD-1 in Verbindung gebracht werden, was entweder eine anderweitige Endozytose oder den Verlust des Antikörper-Epitops nahelegt. [127] Die unterschiedliche intrazelluläre Anreicherung der PD-1-Antikörper bei Pentcheva-Hoang könnte auf unterschiedliche PD-1-Antikörper in Allison's und unserem Labor zurückzuführen sein. Es ist eine Konformitätsvariabilität denkbar, die je nach Proteinfaltung divergente Bindungen im Modell von Allison bedingt, so dass die PD-1-Signale nicht vollständig deckungsgleich mit der PD-1 Präsenz sind. Andererseits ist auch in unserem Fall eine Crossreaktion unseres PD-1-Antikörpers mit anderen zytosolischen Antigenen denkbar. Ein Einfluss der PD-1-Genmodifikation auf das zytosolische Verhalten ist unwahrscheinlich, da auch PD-1 Wildtyp-Zellen genauso wie PD-1ko und PD-1tg Zellen eine ubiquitäre intrazelluläre Anreicherung aufwiesen. Eine Negativkontrolle für die intrazelluläre Färbung war nur konventionell mit Isotyp-Antikörpern möglich, nicht jedoch durch weiteres Gen-Knockout.

Sun et al. hatten anhand Immunfluoreszenz-Labeling B7-Moleküle in Abhängigkeit der T-Zell-Aktivierung untersucht und postuliert, dass PD-1 und PD-L1 kolokalisieren. [154] Die Färbung erfolgte mit den Fluorochromen Cy3 und FITC, mit Emissionen von 566 bzw. 520 nm. Ein weiteres Problem der Immunfluoreszenz mit Einsatz unterschiedlicher Farben und unterschiedlicher Spektren ist der spektrale Overlap: ein Fluorochrom kann in Abhängigkeit seiner spezifischen Emissionswellenlänge in mehr als nur einem Filterbereich detektiert werden. Kommen nun zwei Fluorochrome zum Einsatz, deren Emission sich nicht ausreichend unterscheidet, könnte im zugehörigen Filter des einen Farbstoffs auch der andere wahrgenommen werden, also durchscheinen. Die Fluorochrom-Wahl von Sun et al. hatte das Potential zum Overlap. (Abbildung 4.1) Auch fehlte die Angabe von

Negativkontrollen für die Färbung. Unser Modell hingegen lieferte mit PD-1ko Zellen eine valide Knockout-Negativ-Kontrolle für die Oberflächen-Analyse. Auch wurden mit den vorrangig eingesetzten Farbstoffen FITC und AlexaFluor-568 sowie AlexaFluor-647 Spektren gewählt, deren Überschneidung geringer als bei Sun ausfiel und somit eine geringere Wahrscheinlichkeit des Overlaps ermöglichte.

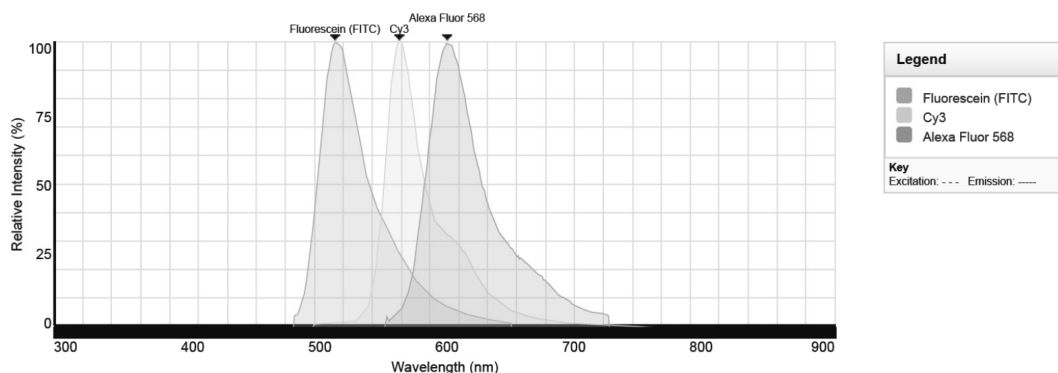


Abbildung 4.1.: Fluorochrom Spektren: Anzeige der Emissionswellenlängen der drei Fluorochrom FITC, Cy3 und AlexaFluor568 sowie das Überlappungspotential. (aus: Invitrogen Spectra Viewer - <http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Analysis/Labeling-Chemistry/Fluorescence-SpectraViewer.html>)

Wir validierten die Lokalisierung von PD-1 während der Konjugatbildung, indem wir Strukturen der Immunsynapse markierten: der transgene TCR 2C, CD3 als Teil des TCR-Komplexes sowie Tubulin und damit der MTOC. Die Aktivierung des TCR führt zur Ausbildung der immunologischen Synapse, die aus dem TCR-Komplex und umgebenden Integrinstrukturen besteht. [65] Im Anschluss polarisiert der MTOC direkt unterhalb der Immunsynapse. [61] Die räumliche Zuordnung von PD-1 sowohl zum TCR bzw. TCR-assoziierten Molekülen als auch zum MTOC erlaubte bimodal die Aussage, dass PD-1 während der Synapsenbildung an eben diese polarisiert wird. Dies erweitert und unterstreicht die Erkenntnisse von Pentcheva-Hoang, die im Gegensatz zu unserem Modell die T-Zell-DC-Interaktion untersuchte, in der ein B7-Kostimulus die T-Zell-Aktivierung forciert: Im Labor von Allison konnte gezeigt werden, dass PD-1 an der CD4-DC-Synapse akkumuliert. Diese Anhäufung von PD-1 hing von der Anwesenheit eines PD-1-Liganden auf den DCs und deren Affinität ($PD-L2 > PD-L1$) zu PD-1 ab. In Abwesenheit von PD-L2 war die Anwesenheit von PD-L1 jedoch ausschlaggebend für den mikroskopischen Nachweis von PD-1 an der Interaktionsstelle. [127] Nicht geklärt ist bisher, ob dieser Effekt von PD-L1 auf die gesteigerte Nachweisbarkeit von PD-1 darauf

zurückzuführen ist, dass PD-L1 aktiv die PD-1-Akkumulation beeinflusst, oder ob primär die PD-1-Aufregulierung Folge der TCR-Aktivierung ist und PD-1 sekundär durch die Interaktion mit PD-L1 an der Synapse stabilisiert wird – was dadurch die erhöhte Darstellbarkeit von PD-1 an der Synapse erklären könnte. Die Kinetik der Rekrutierung von PD-1 an der Synapse wird ähnlich den Vorgängen von CD28 und CTLA-4 [128] beschrieben. In der initialen Phase der Konjugatbildung waren CD28 und PD-1 in den selben Regionen der T-Zellen zu finden; im weiteren Verlauf zeigte sich das PD-1 Expressionsmuster weitreichender verteilt. Die T-Zell-Aktivierung über TCR-Signale bewirkt die Neu-Organisation des Zellskeletts [19], was dann nicht nur zur Konzentrierung von CD28 an der Immunsynapse, sondern auch von PD-1 führt. [127] In unserem Modell spielt ausschließlich PD-L1 eine Rolle, da PD-L2/B7-DC nicht von dem Tumor B16.SIY exprimiert wird. Eine Aussage über die Bindungspräferenz von PD-1 gegenüber den zwei Liganden lässt sich also in unserem Modell bislang nicht beantworten. Auch ist eine weitere zeitliche Korrelation der PD-1 Lokalisation während des Tumorkontakts von Interesse, nachdem im T-Zell-DC-Kontakt gezeigt wurde, dass nach initialer Akkumulation an der Synapse im weiteren zeitlichen Verlauf PD-1 wieder eine dispersere Verteilung auf der Zelloberfläche erfährt. [127]

Yokosuka et al. konnte zuletzt in einem *in vitro*-Assay unsere Ergebnisse weiter bestätigen und zeigen, dass PD-1 in Microclustern mit dem T-Zell-Rezeptor kolokalisiert, wenn es an PD-L1 bindet. Hierbei kam ein glas-basierendes planares Bilayer-System zum Einsatz, das durch Beschichtung mit einem Antigen, mit dem Kostimulus CD80 sowie mit PD-L1 versehen worden war. Nach Kultivierung von antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen und deren Bindung an das Bilayer-System konnte die Kolokalisierung von PD-1 und TCR in Microclustern und die Akkumulation am cSMAC nachgewiesen werden. [174] Ähnliches wurde in chronischen viralen Infektionsmodellen gezeigt, in denen PD-1 und PD-L1 an den cSMACs lokalisiert wird. [178] Die von Yokosuka beschriebene Anordnung von PD-1 in Microclustern nach T-Zell-Aktivierung ist sehr gut vereinbar mit unserem Nachweis der Formierung von PD-1-Clustern auf der T-Zell-Oberfläche nach Stimulation. In CD4⁺ T-Zellen konnte von Yokosuka darüber hinaus gezeigt werden, dass nicht nur die Microcluster-Bildung sondern auch die Kolokalisation mit dem TCR notwendig für die inhibitorische Wirkung von PD-1 ist. [174]

Die Ergebnisse von Pentcheva-Hoang und Yokosuka untermauern zusammengefasst unsere Beobachtungen, in denen wir erstmals während der T-Zell-Tumor-Interaktion zeigen konnten, dass T-Zellen PD-1 während der Konjugatbildung mit Zieltumorzellen an der Synapse akkumulieren.

Die Immunfluoreszenz-Untersuchungen in unserem Modell, das durch Kokultur von T-Zellen und Tumorzellen deutlich erschwert war, erfolgten zur eindeutigeren Signalgewinnung mit PD-1-überexprimierenden Zellen. Weitere Untersuchungen bzw. eine Optimierung der Technik ist Voraussetzung, um valide Aussagen über das Verhalten von PD-1 in einem nicht gen-modifizierten Modell treffen zu können. Fasst man jedoch zusammen, dass in unseren Beobachtungen PD-1 an der Immunsynapse von PD-1tg Zellen akkumuliert und gleichzeitig gerade diese Zellen mit einer verminderten T-Zell-Funktionalität einhergehen, liegt nahe, dass die PD-1 Konzentration an der Synapse mit dem Effekt der T-Zell-Hemmung korreliert.

Da somit eine Konzentrationsabhängigkeit suggestiv ist, folgte die Frage, ob dies auch für den Liganden auf den Tumorzellen der Fall ist. Eine Akkumulierung von PD-L1 auf Tumorzellen nach Erkennung durch die T-Zellen und Synapsenbildung, wäre also mit einer Art Selbstverteidigungsmechanismus zu interpretieren. Entsprechende Analysen von PD-L1 auf dem Target-Tumor B16.SIY (nach Immunaktivierung durch Interferon-Exposition) zeigte jedoch, dass es nicht zu einer Polarisierung von PD-L1 an der Synapse kommt, sondern dass PD-L1 unverändert ubiquitär in Clustern exprimiert wird.

Wenn der Ziel-Tumor B16.SIY nicht mit IFN immunaktiviert wurde, wurden weder PD-L1 noch das spezifische Antigen exprimiert, wodurch keine TCR-Stimulation und Ausbildung des „Kiss of Death“ stattfinden konnte. Der direkte Einfluss von PD-L1 auf die PD-1-Polarisierung der T-Zelle ist in diesem Modell nicht eindeutig beurteilbar. Es bleibt zu untersuchen, ob die Polarisierung von PD-1 auf der T-Zelle nach Kontakt mit einer Tumorart, die kein PD-L1 exprimiert, ebenfalls auftritt. Ob die Konzentration von PD-1 an der T-Zell-Tumor-Kontaktstelle höher wäre, wenn sich auch der Ligand auf dem Tumor an der Synapse versammelt, ist ungewiss. Die Ergebnisse der funktionellen Assays zeigen jedoch, dass auch die breite Expression von PD-L1 auf B16.SIY-IFN Zellen ausreicht, um T-Zellen über den PD-1-Signalweg zu hemmen.

Im Gegensatz zu DCs scheint die Polarisierung von PD-1 auf CD8⁺ Zellen allerdings nicht von der Konzentration von PD-L1 bestimmt zu sein, da zwar PD-L1 erst nach der Immunaktivierung durch Interferon-Gabe auf dem Tumor hochreguliert wird, dann aber nicht spezifisch in Richtung Synapse mobilisiert wird. Es gibt also keinen Anhalt für eine gezielte Selbstverteidigungsreaktion des Tumors nach T-Zell-Attacke. Die Hemmung der T-Zell-Funktionalität ist auch mit konstitutiver Expression von PD-L1 ausreichend. Zusammenfassend konnten wir erstmalig zeigen, dass keine Polarisierung von PD-L1 im Sinne eines Counterattack auf Tumorzellen stattfindet.

4.5. Zellpolarisierung in Abhängigkeit der PD-1-Expression

Wie oben bereits beschrieben, ist die Antigenerkennung und Synapsenbildung mit der Translokation des MTOC an die Synapse verbunden. Dies ist essentiell notwendig, um die gezielte Ausschüttung von zytotoxischen Substanzen in den Synapsenspalt zu ermöglichen. [76] Frey und Radoja konnten demonstrieren, dass die Unfähigkeit von TILs, Zielzellen zu zerstören, durch deren mangelhafte MTOC-Translokation bedingt ist. [133] Daher untersuchten wir die Fähigkeit der Zellpolarisierung bzw. der MTOC-Translokation in Abhängigkeit des Aktivierungszustands und des PD-1 Phänotyps. PD-1 ist in unserem Modell direkt verantwortlich für die Hemmung der T-Zell-Funktionalität und geht eine räumliche Nähe mit TCR und MTOC während der Kontaktbildung ein. Ein signifikanter Einfluss von PD-1 auf die MTOC-Translokation konnte als Verbindungsstück zwischen PD-1-Expression und T-Zell-Hemmung nicht beobachtet werden. In T-Zellen, die durch TCR-Aktivierung und B7-Kostimulation ein hohes Aktivitätsniveau erreicht hatten, konnte keine Abhängigkeit der MTOC-Translokation von der PD-1-Expression festgestellt werden, analog zur PD-1 unabhängigen Proliferation. Hingegen deutete sich besonders in wiederholt stimulierten T-Zellen eine Tendenz zur PD-1 Abhängigkeit an, in der PD-1-Expression eine Verminderung der MTOC-Polarisation bedingt.

Aus dieser Beobachtung kann man die Hypothese ableiten, dass T-Zellen im Zustand der „Exhaustion“ einen zunehmenden Einfluss durch PD-1 erfahren, wobei die PD-1 vermittelte Hemmung der T-Zell-Funktionalität, die wir in unseren Experimenten beweisen konnten, unter anderem auf der Ebene der Zytoskelett-Transformation und der verminderten Fähigkeit zur Synapsenbildung bedingt ist.

Diese Beobachtung wäre vereinbar mit der Erkenntnis, dass PD-1 das Stop-Signal nach TCR-Aktivierung verhindert. [52] Dieses TCR-vermittelte Stop-Signal befähigt erst die T-Zelle, die Eigen-Motilität zu verringern, dadurch ausreichenden physischen Kontakt mit Zielzellen herzustellen, die Oberfläche nach Antigenen zu scannen und eine positive Antigen-Erkennung zu ermöglichen. [47] Eine verringerte Fähigkeit zur MTOC-Translokation in T-Zellen führt demnach auch zu eingeschränkter Synapsen-Ausbildung und damit direkt verbunden zur gehemmten Lysefähigkeit. Diese Dysfunktionalität wird insbesondere in „exhausted“ T-Zellen beobachtet. Honjo et al. konnten zeigen, dass PD-1 mit LAG-3 synergistisch bei der Ausbildung von Toleranz wirkt. [120] Es wäre also des Weiteren von Interesse, auch das Zusammenwirken bei der Tumorabstoßung und

hierbei den Einfluss auf die Zellmotilität und das Zellskelett zu untersuchen. Auch hier gilt jedoch, dass unsere Korrelation von PD-1 und der T-Zell-Polarisierung erstmalig im Rahmen der T-Zell-Tumor-Interaktion untersucht wurde, da oben genannte Ergebnisse von Fife et al. stets die Interaktion von T-Zelle und dendritischer Zelle zur Grundlage hatten. Die Gruppe von Saito konnte zeigen, dass in $CD4^+$ Lymphozyten PD-1 mit dem TCR kolokalisieren muss, um das Stop-Signal zu inhibieren, wodurch im zweiten Schritt die Ausbildung stabiler Synapsen reduziert wird. [174] Es sind noch weitere Untersuchungen notwendig, unter anderem auch mit Blockade des PD-L1-Signals durch PD-L1-Antikörper, um damit die beschriebene negative Wirkung von PD-L1 über den zweiten Rezeptor B7-1 [24] hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf die T-Zell-Motilität zu analysieren. Unter anderem findet sich in der komplexen Kaskade, die für die T-Zell-Rezeptor-Aktivierung und für die Zytoskelett-Veränderung verantwortlich zeichnet, die Kinase PKC- θ , die nach T-Zell-Aktivierung an der Immunsynapse aufreguliert wird. [94] PKC- θ wird unter anderem mit der Ausrichtung der Tubulin-Strukturen bzw. des MTOC in Verbindung gebracht. [140] Da diese Kinasen-Aktivierung notwendig zur Ausübung lytischer Funktionen ist, ist eine entsprechende Hemmung der Kinase mit einer Funktionalitätshemmung assoziierbar. [112] PD-1 inhibiert unter anderem die Phosphorylierung von PKC- θ [146], weshalb eine negative Auswirkung der PD-1-Signalisierung auf die MTOC-Translokation bzw. auf die Fähigkeit der T-Zelle, das Zytoskelett für eine entsprechende Tumorreaktion auszurichten, durchaus denkbar ist.

Mit den vorliegenden Ergebnissen lässt sich nicht abschließend beantworten, ob die MTOC-Polarisierung direkt durch PD-1 beeinflusst wird und dies einen klaren Anteil an der T-Zell-Inhibition hat, oder ob die PD-1-vermittelte Inhibition alleine durch eine Minderung des TCR-Signals erfolgt, und der marginale beobachtete Einfluss auf die MTOC-Polarisierung Folge der globalen Zellhemmung ist. Jedoch sind die Ergebnisse dieser Arbeit suggestiv, dass PD-1 an der Immunsynapse akkumuliert, und dadurch während der Interaktion von $CD8^+$ T-Zelle und Tumorzelle die TCR-Aktivierung inhibiert, mit einem negativen Effekt auf die T-Zell-Funktionalität samt Zytokinproduktion, Proliferation, Zytotoxizität und Zellmotilität.

5. Zusammenfassung

PD-1 und sein Ligand PD-L1 spielen als Teil der B7-Familie eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Hemmung, die physiologisch bei der Toleranzentwicklung zum Einsatz kommt, jedoch gerade auch von Tumoren als Immunsuppressionsmechanismus genutzt wird. Essentiell für die Tumorabstossung durch CD8⁺ T-Zellen ist die Antigenerkennung, Synapsen- und Konjugatbildung sowie effektive Tumorlyse. Bislang war anhand von Bead-Experimenten davon ausgegangen worden, dass PD-1 mit dem T-Zell-Rezeptor kolokalisieren müsse, um inhibitorisch zu wirken.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Schlussfolgerung auf technischen Mängeln wegen insuffizienter Beadstimulation beruhte. Daher wurde ein murines TCR transgenes Tumormodell etabliert und PD-1 defiziente, Wildtyp und PD-1 transgene T-Zellen charakterisiert. In Anwesenheit eines B7-Kostimulus hatte die Expression von PD-1 im Rahmen repetitiver Stimulationen weder Einfluss auf Aktivierung noch Entwicklung von Exhaustion. In Abwesenheit des Kostimulus konnte die PD-1-Abhängigkeit und die PD-1-vermittelte Hemmung von Zytokin-Produktion sowie proliferativer und zytotoxischer Effektivität durch Kokultivierung der T-Zellen mit PD-L1-exprimierender Tumorzellen gezeigt werden. Ein Einfluss von lymphozytärem PD-L1 im Sinne einer inter-lymphozytären Interaktion konnte ausgeschlossen werden. Anhand von Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte die PD-1-Anordnung sowohl intrazellulär wie auch auf der Oberfläche dargestellt werden. T-Zell-Aktivierung führt dabei zur Aufregulierung von PD-1 auf Wildtypzellen sowie zur Verdichtung in Clustern. Erstmals wurde dabei gezeigt, dass PD-1 während der Interaktion von T-Zellen und Tumorzellen an der Immunsynapse mit dem T-Zell-Rezeptor bzw. dem MTOC akkumuliert. PD-L1 auf T-Zellen erfährt hingegen keine Veränderung der Oberflächenexpression im Rahmen der Aktivierung bzw. der Tumorbildung. Ebenfalls erstmalig konnte im nächsten Schritt demonstriert werden, dass während dieser Interaktion keine PD-L1-Polarisierung von Seiten des Tumors im Sinne eines Counterattack stattfindet, bzw. notwendig ist, um in diesem Modell eine suffiziente T-Zell-Hemmung zu erreichen. Teil dieser PD-1 vermittelten T-Zell-Hemmung könnte ein Einfluss auf die Polarisierung des MTOC während der

Synapsenbildung sein, was jedoch nicht signifikant, sondern lediglich mit einer Tendenz zur PD-1-vermittelten Hemmung auffiel. Analog fiel die Beobachtung der Polarisierung zytotoxischer Granula aus.

Aufgrund diffiziler Immunfluoreszenz-Analysen ist ausblickend eine weitere Analyse der PD-1-Expression auf Wildtypzellen während der Interaktion notwendig und eine Untersuchung des Einfluss von PD-1 auf den Transport zytotoxischer Granula. Insgesamt unterstreichen unsere Ergebnisse die Erkenntnis, dass PD-L1 auf Tumoren eine wichtige Rolle beim Immunescape spielen, da T-Zellen in ihrer Funktionalität, womöglich sogar bereits in ihrer Polarisierungskapazität und Zellmotilität gehemmt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] A. K. Abbas and C. A. Janeway, Jr. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell*, 100(1):129–38, Jan 2000.
- [2] A. K. Abbas and A. H. Sharpe. T-cell stimulation: an abundance of b7s. *Nat Med*, 5(12):1345–1346, Dec 1999.
- [3] H. Abken, A. Hombach, C. Heuser, K. Kronfeld, and B. Seliger. Tuning tumor-specific t-cell activation: a matter of costimulation? *Trends Immunol*, 23(5):240–5, May 2002.
- [4] O. Acuto and F. Michel. Cd28-mediated co-stimulation: a quantitative support for tcr signalling. *Nat Rev Immunol*, 3(12):939–51, Dec 2003.
- [5] Y. Agata, A. Kawasaki, H. Nishimura, Y. Ishida, T. Tsubata, H. Yagita, and T. Honjo. Expression of the pd-1 antigen on the surface of stimulated mouse t and b lymphocytes. *Int Immunol*, 8(5):765–772, May 1996.
- [6] M. Ahmad, R. C. Rees, and S. A. Ali. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother*, 53(10):844–54, Oct 2004.
- [7] M. Ahmadzadeh, L. A. Johnson, B. Heemskerk, J. R. Wunderlich, M. E. Dudley, D. E. White, and S. A. Rosenberg. Tumor antigen-specific cd8 t cells infiltrating the tumor express high levels of pd-1 and are functionally impaired. *Blood*, 114(8):1537–44, Aug 2009.
- [8] M. J. I. Ansari, A. D. Salama, T. Chitnis, R. N. Smith, H. Yagita, H. Akiba, T. Yamazaki, M. Azuma, H. Iwai, S. J. Khoury, H. Auchincloss, Jr, and M. H. Sayegh. The programmed death-1 (pd-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (nod) mice. *J Exp Med*, 198(1):63–9, Jul 2003.

- [9] D. L. Barber, E. J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J. P. Allison, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, and R. Ahmed. Restoring function in exhausted cd8 t cells during chronic viral infection. *Nature*, 439(7077):682–687, 2006 Feb 9.
- [10] C. N. Baxevanis, P. A. Sotiropoulou, N. N. Sotiriadou, and M. Papamichail. Immunobiology of her-2/neu oncoprotein and its potential application in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 53(3):166–75, Mar 2004.
- [11] F. Bennett, D. Luxenberg, V. Ling, I.-M. Wang, K. Marquette, D. Lowe, N. Khan, G. Veldman, K. A. Jacobs, V. E. Valge-Archer, M. Collins, and B. M. Carreno. Program death-1 engagement upon tcr activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of icos, il-4, and il-21, but not cd28, il-7, and il-15 responses. *J Immunol*, 170(2):711–718, 2003 Jan 15.
- [12] G. Berke. The ctl’s kiss of death. *Cell*, 81(1):9–12, Apr 1995.
- [13] D. D. Billadeau, J. C. Nolz, and T. S. Gomez. Regulation of t-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol*, 7(2):131–43, Feb 2007.
- [14] C. Blank, I. Brown, R. Marks, H. Nishimura, T. Honjo, and T. F. Gajewski. Absence of programmed death receptor 1 alters thymic development and enhances generation of cd4/cd8 double-negative tcr-transgenic t cells. *J Immunol*, 171(9):4574–4581, 2003 Nov 1.
- [15] C. Blank, I. Brown, A. C. Peterson, M. Spiotto, Y. Iwai, T. Honjo, and T. F. Gajewski. Pd-l1/b7h-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by t cell receptor (tcr) transgenic cd8+ t cells. *Cancer Res*, 64(3):1140–1145, 2004 Feb 1.
- [16] C. Blank, T. F. Gajewski, and A. Mackensen. Interaction of pd-l1 on tumor cells with pd-1 on tumor-specific t cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 54(4):307–314, Apr 2005.
- [17] G. C. Blobe, W. P. Schiemann, and H. F. Lodish. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*, 342(18):1350–8, May 2000.
- [18] T. Boon, P. G. Coulie, and B. Van den Eynde. Tumor antigens recognized by t cells. *Immunol Today*, 18(6):267–8, Jun 1997.

- [19] S. K. Bromley, W. R. Burack, K. G. Johnson, K. Somersalo, T. N. Sims, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol*, 19:375–96, 2001.
- [20] D. G. Brooks, L. Teyton, M. B. A. Oldstone, and D. B. McGavern. Intrinsic functional dysregulation of cd4 t cells occurs rapidly following persistent viral infection. *J Virol*, 79(16):10514–27, Aug 2005.
- [21] S. C. Bunnell, V. Kapoor, R. P. Tribble, W. Zhang, and L. E. Samelson. Dynamic actin polymerization drives t cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor lat. *Immunity*, 14(3):315–29, Mar 2001.
- [22] F. M. Burnet. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*, 13:1–27, 1970.
- [23] M. BURNET. Cancer; a biological approach. i. the processes of control. *Br Med J*, 1(5022):779–86, Apr 1957.
- [24] M. J. Butte, M. E. Keir, T. B. Phamduy, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the b7-1 costimulatory molecule to inhibit t cell responses. *Immunity*, 27(1):111–122, 2007 Jul.
- [25] C. M. Cabrera, P. Jiménez, T. Cabrera, C. Esparza, F. Ruiz-Cabello, and F. Garrido. Total loss of mhc class i in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in msi-positive tumors and lmp7/tap2 downregulation in msi-negative tumors. *Tissue Antigens*, 61(3):211–9, Mar 2003.
- [26] M. F. Callan, C. Fazou, H. Yang, T. Rostron, K. Poon, C. Hatton, and A. J. McMichael. Cd8(+) t-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo. *J Clin Invest*, 106(10):1251–61, Nov 2000.
- [27] J. Candido and T. Hagemann. Cancer-related inflammation. *J Clin Immunol*, 33 Suppl 1:S79–84, Jan 2013.
- [28] S. R. Carding and P. J. Egan. Gammadelta t cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 2(5):336–45, May 2002.
- [29] L. Carter, L. A. Fouser, J. Jussif, L. Fitz, B. Deng, C. R. Wood, M. Collins, T. Honjo, G. J. Freeman, and B. M. Carreno. Pd-1:pd-l inhibitory pathway affects both cd4(+) and cd8(+) t cells and is overcome by il-2. *Eur J Immunol*, 32(3):634–43, Mar 2002.

- [30] S. Cemerski, J. Das, E. Giurisato, M. A. Markiewicz, P. M. Allen, A. K. Chakraborty, and A. S. Shaw. The balance between t cell receptor signaling and degradation at the center of the immunological synapse is determined by antigen quality. *Immunity*, 29(3):414–22, Sep 2008.
- [31] H. A. Chapman. Endosomal proteolysis and mhc class ii function. *Curr Opin Immunol*, 10(1):93–102, Feb 1998.
- [32] J. M. Chemnitz, R. V. Parry, K. E. Nichols, C. H. June, and J. L. Riley. Shp-1 and shp-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human t cell stimulation, but only receptor ligation prevents t cell activation. *J Immunol*, 173(2):945–954, Jul 2004.
- [33] J. Chen, H. N. Eisen, and D. M. Kranz. A model t-cell receptor system for studying memory t-cell development. *Microbes Infect*, 5(3):233–240, 2003 Mar.
- [34] L. Chen and D. B. Flies. Molecular mechanisms of t cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*, 13(4):227–42, Apr 2013.
- [35] P. G. Coulie. Human tumour antigens recognized by t cells: new perspectives for anti-cancer vaccines? *Mol Med Today*, 3(6):261–8, Jun 1997.
- [36] T. J. Curiel, S. Wei, H. Dong, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, R. Krzysiek, K. L. Knutson, B. Daniel, M. C. Zimmermann, O. David, M. Burow, A. Gordon, N. Dhurandhar, L. Myers, R. Berggren, A. Hemminki, R. D. Alvarez, D. Emilie, D. T. Curiel, L. Chen, and W. Zou. Blockade of b7-h1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med*, 9(5):562–7, May 2003.
- [37] W. F. Davidson, T. Giese, and T. N. Fredrickson. Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective fas-fas ligand interactions. *J Exp Med*, 187(11):1825–38, Jun 1998.
- [38] C. L. Day, D. E. Kaufmann, P. Kiepiela, J. A. Brown, E. S. Moodley, S. Reddy, E. W. Mackey, J. D. Miller, A. J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E. J. Wherry, H. M. Coovadia, P. J. R. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G. J. Freeman, and B. D. Walker. Pd-1 expression on hiv-specific t cells is associated with t-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, 443(7109):350–354, Sep 2006.

- [39] T. De Smedt, M. Van Mechelen, G. De Becker, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol*, 27(5):1229–35, May 1997.
- [40] T. J. de Vries, A. Fourkour, T. Wobbles, G. Verkroost, D. J. Ruiter, and G. N. van Muijen. Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, mart-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. *Cancer Res*, 57(15):3223–9, Aug 1997.
- [41] H. Dong, S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis, and L. Chen. Tumor-associated b7-h1 promotes t-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*, 8(8):793–800, Aug 2002.
- [42] H. Dong, G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. B7-h1, a third member of the b7 family, co-stimulates t-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*, 5(12):1365–9, Dec 1999.
- [43] H. Dong, G. Zhu, K. Tamada, D. B. Flies, J. M. A. van Deursen, and L. Chen. B7-h1 determines accumulation and deletion of intrahepatic cd8(+) t lymphocytes. *Immunity*, 20(3):327–36, Mar 2004.
- [44] M. D’Souza, A. P. Fontenot, D. G. Mack, C. Lozupone, S. Dillon, A. Meditz, C. C. Wilson, E. Connick, and B. E. Palmer. Programmed death 1 expression on hiv-specific cd4+ t cells is driven by viral replication and associated with t cell dysfunction. *J Immunol*, 179(3):1979–87, Aug 2007.
- [45] M. E. Dudley, J. R. Wunderlich, P. F. Robbins, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, R. Sherry, N. P. Restifo, A. M. Hubicki, M. R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C. A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, D. E. White, and S. A. Rosenberg. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*, 298(5594):850–4, Oct 2002.
- [46] G. P. Dunn, A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3(11):991–8, Nov 2002.

- [47] M. L. Dustin, S. K. Bromley, Z. Kan, D. A. Peterson, and E. R. Unanue. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating t lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(8):3909–13, Apr 1997.
- [48] P. Ehrlich. Über den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 5, 273-290, 1909.
- [49] M. J. Eppihimer, J. Gunn, G. J. Freeman, E. A. Greenfield, T. Chernova, J. Erickson, and J. P. Leonard. Expression and regulation of the pd-l1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation*, 9(2):133–45, Apr 2002.
- [50] P. Fields, F. W. Fitch, and T. F. Gajewski. Control of t lymphocyte signal transduction through clonal anergy. *J Mol Med*, 74(11):673–83, Nov 1996.
- [51] P. E. Fields, T. F. Gajewski, and F. W. Fitch. Blocked ras activation in anergic cd4+ t cells. *Science*, 271(5253):1276–8, Mar 1996.
- [52] B. T. Fife, K. E. Pauken, T. N. Eagar, T. Obu, J. Wu, Q. Tang, M. Azuma, M. F. Krummel, and J. A. Bluestone. Interactions between pd-1 and pd-l1 promote tolerance by blocking the tcr-induced stop signal. *Nat Immunol*, 10(11):1185–92, Nov 2009.
- [53] C. J. Fox, P. S. Hammerman, and C. B. Thompson. Fuel feeds function: energy metabolism and the t-cell response. *Nat Rev Immunol*, 5(11):844–52, Nov 2005.
- [54] L. M. Francisco, P. T. Sage, and A. H. Sharpe. The pd-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*, 236:219–42, Jul 2010.
- [55] G. J. Freeman, A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo. Engagement of the pd-1 immunoinhibitory receptor by a novel b7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, 192(7):1027–1034, Oct 2000.
- [56] G. J. Freeman, E. J. Wherry, R. Ahmed, and A. H. Sharpe. Reinvigorating exhausted hiv-specific t cells via pd-1-pd-1 ligand blockade. *J Exp Med*, 203(10):2223–7, Oct 2006.

- [57] J. Gadiot, A. I. Hooijkaas, A. D. M. Kaiser, H. van Tinteren, H. van Boven, and C. Blank. Overall survival and pd-l1 expression in metastasized malignant melanoma. *Cancer*, 117(10):2192–201, May 2011.
- [58] T. F. Gajewski. B7-1 but not b7-2 efficiently costimulates cd8+ t lymphocytes in the p815 tumor system in vitro. *J Immunol*, 156(2):465–472, 1996 Jan 15.
- [59] T. F. Gajewski, Y. Meng, C. Blank, I. Brown, A. Kacha, J. Kline, and H. Harlin. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunol Rev*, 213:131–45, Oct 2006.
- [60] T. F. Gajewski, Y. Meng, and H. Harlin. Immune suppression in the tumor microenvironment. *J Immunother*, 29(3):233–40, 2006.
- [61] B. Geiger, D. Rosen, and G. Berke. Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic t lymphocytes and target cells. *J Cell Biol*, 95(1):137–43, Oct 1982.
- [62] T. S. Gomez and D. D. Billadeau. T cell activation and the cytoskeleton: you can’t have one without the other. *Adv Immunol*, 97:1–64, 2008.
- [63] S. Goodison, V. Urquidi, and D. Tarin. Cd44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol*, 52(4):189–96, Aug 1999.
- [64] L. Gorelik and R. A. Flavell. Transforming growth factor-beta in t-cell biology. *Nat Rev Immunol*, 2(1):46–53, Jan 2002.
- [65] A. Grakoui, S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin. The immunological synapse: a molecular machine controlling t cell activation. *Science*, 285(5425):221–7, Jul 1999.
- [66] R. J. Greenwald, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. The b7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 23:515–548, 2005.
- [67] Y. Guilloux, C. Viret, N. Gervois, E. Le Dréan, M. C. Pandolfino, E. Diez, and F. Jotereau. Defective lymphokine production by most cd8+ and cd4+ tumor-specific t cell clones derived from human melanoma-infiltrating lymphocytes in response to autologous tumor cells in vitro. *Eur J Immunol*, 24(9):1966–73, Sep 1994.

- [68] S. T. Haile, J. J. Bosch, N. I. Agu, A. M. Zeender, P. Somasundaram, M. K. Srivastava, S. Britting, J. B. Wolf, B. R. Ksander, and S. Ostrand-Rosenberg. Tumor cell programmed death ligand 1-mediated t cell suppression is overcome by coexpression of cd80. *J Immunol*, 186(12):6822–9, Jun 2011.
- [69] J. Hamanishi, M. Mandai, M. Iwasaki, T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Yamaguchi, T. Higuchi, H. Yagi, K. Takakura, N. Minato, T. Honjo, and S. Fujii. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating cd8+ t lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(9):3360–5, Feb 2007.
- [70] D. Hanahan and R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57–70, Jan 2000.
- [71] D. Hanahan and R. A. Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646–74, Mar 2011.
- [72] R. Hino, K. Kabashima, Y. Kato, H. Yagi, M. Nakamura, T. Honjo, T. Okazaki, and Y. Tokura. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*, 116(7):1757–66, Apr 2010.
- [73] F. Hirano, K. Kaneko, H. Tamura, H. Dong, S. Wang, M. Ichikawa, C. Rietz, D. B. Flies, J. S. Lau, G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. Blockade of b7-h1 and pd-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res*, 65(3):1089–96, Feb 2005.
- [74] S. Hirata, S. Senju, H. Matsuyoshi, D. Fukuma, Y. Uemura, and Y. Nishimura. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide along with trail or programmed death-1 ligand. *J Immunol*, 174(4):1888–97, Feb 2005.
- [75] M. Huse. The t-cell-receptor signaling network. *J Cell Sci*, 122(Pt 9):1269–73, May 2009.
- [76] M. Huse, E. J. Quann, and M. M. Davis. Shouts, whispers and the kiss of death: directional secretion in t cells. *Nat Immunol*, 9(10):1105–1111, 2008 Oct.

- [77] Y. Ishida, Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo. Induced expression of pd-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*, 11(11):3887–3895, Nov 1992.
- [78] Y. Iwai, M. Ishida, Y. Tanaka, T. Okazaki, T. Honjo, and N. Minato. Involvement of pd-l1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by pd-l1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(19):12293–12297, Sep 2002.
- [79] Y. Iwai, S. Terawaki, M. Ikegawa, T. Okazaki, and T. Honjo. Pd-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med*, 198(1):39–50, Jul 2003.
- [80] E. Jäger, E. Stockert, Z. Zidianakis, Y. T. Chen, J. Karbach, D. Jäger, M. Arand, G. Ritter, L. J. Old, and A. Knuth. Humoral immune responses of cancer patients against "cancer-testisantigen ny-eso-1: correlation with clinical events. *Int J Cancer*, 84(5):506–10, Oct 1999.
- [81] C. A. Janeway, Jr and R. Medzhitov. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20:197–216, 2002.
- [82] A. D. Kaiser, K. Schuster, J. Gadiot, L. Borkner, H. Daebritz, C. Schmitt, R. Andreesen, and C. Blank. Reduced tumor-antigen density leads to pd-1/pd-l1-mediated impairment of partially exhausted cd8⁺ t cells. *Eur J Immunol*, 42(3):662–71, Mar 2012.
- [83] L. P. Kane, J. Lin, and A. Weiss. Signal transduction by the tcr for antigen. *Curr Opin Immunol*, 12(3):242–9, Jun 2000.
- [84] D. H. Kaplan, V. Shankaran, A. S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L. J. Old, and R. D. Schreiber. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13):7556–61, Jun 1998.
- [85] H. Kase, Y. Aoki, and K. Tanaka. Fas ligand expression in cervical adenocarcinoma: relevance to lymph node metastasis and tumor progression. *Gynecol Oncol*, 90(1):70–4, Jul 2003.
- [86] M. E. Keir, M. J. Butte, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. Pd-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 26:677–704, 2008.

- [87] M. E. Keir, Y. E. Latchman, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. Programmed death-1 (pd-1):pd-ligand 1 interactions inhibit tcr-mediated positive selection of thymocytes. *J Immunol*, 175(11):7372–7379, 2005 Dec 1.
- [88] H. T. Khong and N. P. Restifo. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape"phenotypes. *Nat Immunol*, 3(11):999–1005, Nov 2002.
- [89] P. S. Kim and R. Ahmed. Features of responding t cells in cancer and chronic infection. *Curr Opin Immunol*, 22(2):223–30, Apr 2010.
- [90] R. Kim, M. Emi, and K. Tanabe. Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer Biol Ther*, 4(9):924–33, Sep 2005.
- [91] R. Kim, M. Emi, and K. Tanabe. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1):1–14, May 2007.
- [92] M. Koneru, N. Monu, D. Schaer, J. Barletta, and A. B. Frey. Defective adhesion in tumor infiltrating cd8+ t cells. *J Immunol*, 176(10):6103–6111, May 2006.
- [93] M. Koneru, D. Schaer, N. Monu, A. Ayala, and A. B. Frey. Defective proximal tcr signaling inhibits cd8+ tumor-infiltrating lymphocyte lytic function. *J Immunol*, 174(4):1830–1840, Feb 2005.
- [94] K.-F. Kong and A. Altman. In and out of the bull’s eye: protein kinase cs in the immunological synapse. *Trends Immunol*, 34(5):234–42, May 2013.
- [95] J. Konishi, K. Yamazaki, M. Azuma, I. Kinoshita, H. Dosaka-Akita, and M. Nishimura. B7-h1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their pd-1 expression. *Clin Cancer Res*, 10(15):5094–100, Aug 2004.
- [96] D. M. Kranz, S. Tonegawa, and H. N. Eisen. Attachment of an anti-receptor antibody to non-target cells renders them susceptible to lysis by a clone of cytotoxic t lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(24):7922–7926, 1984 Dec.
- [97] A. Kroner, M. Mehling, B. Hemmer, P. Rieckmann, K. V. Toyka, M. Mäurer, and H. Wiendl. A pd-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 58(1):50–7, Jul 2005.

- [98] S. Krüger-Krasagakes, K. Krasagakis, C. Garbe, E. Schmitt, C. Hüls, T. Blankenstein, and T. Diamantstein. Expression of interleukin 10 in human melanoma. *Br J Cancer*, 70(6):1182–5, Dec 1994.
- [99] A. Kupfer, T. R. Mosmann, and H. Kupfer. Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper t cells and splenic b cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(3):775–9, Feb 1991.
- [100] K. J. Lafferty and J. Woolnough. The origin and mechanism of the allograft reaction. *Immunol Rev*, 35:231–62, 1977.
- [101] Y. Latchman, C. R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A. J. Long, J. A. Brown, R. Nunes, E. A. Greenfield, K. Bourque, V. A. Boussiotis, L. L. Carter, B. M. Carreno, N. Malenkovich, H. Nishimura, T. Okazaki, T. Honjo, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman. Pd-l2 is a second ligand for pd-l1 and inhibits t cell activation. *Nat Immunol*, 2(3):261–8, Mar 2001.
- [102] Y. E. Latchman, S. C. Liang, Y. Wu, T. Chernova, R. A. Sobel, M. Klemm, V. K. Kuchroo, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. Pd-l1-deficient mice show that pd-l1 on t cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates t cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(29):10691–6, Jul 2004.
- [103] S. Laxmanan, S. W. Robertson, E. Wang, J. S. Lau, D. M. Briscoe, and D. Mukhopadhyay. Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through id pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 334(1):193–8, Aug 2005.
- [104] R. Li, D. Rüttinger, R. Li, L.-S. Si, and Y.-L. Wang. Analysis of the immunological microenvironment at the tumor site in patients with non-small cell lung cancer. *Langenbecks Arch Surg*, 388(6):406–12, Dec 2003.
- [105] I. M. Medana, A. Gallimore, A. Oxenius, M. M. Martinic, H. Wekerle, and H. Neumann. Mhc class i-restricted killing of neurons by virus-specific cd8+ t lymphocytes is effected through the fas/fasl, but not the perforin pathway,. *Eur J Immunol*, 30(12):3623–33, Dec 2000.
- [106] J. P. Medema, J. de Jong, T. van Hall, C. J. Melief, and R. Offringa. Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular flice-inhibitory protein. *J Exp Med*, 190(7):1033–8, Oct 1999.

- [107] Y. Meng, H. Harlin, J. P. O’Keefe, and T. F. Gajewski. Induction of cytotoxic granules in human memory cd8+ t cell subsets requires cell cycle progression. *J Immunol*, 177(3):1981–7, Aug 2006.
- [108] P. Mombaerts, J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. Rag-1-deficient mice have no mature b and t lymphocytes. *Cell*, 68(5):869–877, Mar 1992.
- [109] C. R. Monks, B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in t cells. *Nature*, 395(6697):82–6, Sep 1998.
- [110] S. Mumprecht, C. Schürch, J. Schwaller, M. Solenthaler, and A. F. Ochsenbein. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific t cells results in t-cell exhaustion and disease progression. *Blood*, 114(8):1528–36, Aug 2009.
- [111] S. Nakae, H. Suto, M. Iikura, M. Kakurai, J. D. Sedgwick, M. Tsai, and S. J. Galli. Mast cells enhance t cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted tnf. *J Immunol*, 176(4):2238–48, Feb 2006.
- [112] D. Nesić, S. Henderson, and S. Vukmanović. Prevention of antigen-induced microtubule organizing center reorientation in cytotoxic t cells by modulation of protein kinase c activity. *Int Immunol*, 10(11):1741–6, Nov 1998.
- [113] H. Nishimura, Y. Agata, A. Kawasaki, M. Sato, S. Imamura, N. Minato, H. Yagita, T. Nakano, and T. Honjo. Developmentally regulated expression of the pd-1 protein on the surface of double-negative (cd4-cd8-) thymocytes. *Int Immunol*, 8(5):773–80, May 1996.
- [114] H. Nishimura, T. Honjo, and N. Minato. Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of pd-1-deficient mice. *J Exp Med*, 191(5):891–8, Mar 2000.
- [115] H. Nishimura, N. Minato, T. Nakano, and T. Honjo. Immunological studies on pd-1 deficient mice: implication of pd-1 as a negative regulator for b cell responses. *Int Immunol*, 10(10):1563–1572, 1998 Oct.
- [116] H. Nishimura, M. Nose, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the pd-1 gene encoding an itim motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11(2):141–51, Aug 1999.

- [117] H. Nishimura, T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Nakatani, M. Hara, A. Matsumori, S. Sasayama, A. Mizoguchi, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo. Autoimmune dilated cardiomyopathy in pd-1 receptor-deficient mice. *Science*, 291(5502):319–22, Jan 2001.
- [118] T. Okazaki and T. Honjo. The pd-1-pd-l pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol*, 27(4):195–201, Apr 2006.
- [119] T. Okazaki, A. Maeda, H. Nishimura, T. Kurosaki, and T. Honjo. Pd-1 immunoreceptor inhibits b cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(24):13866–71, Nov 2001.
- [120] T. Okazaki, I.-M. Okazaki, J. Wang, D. Sugiura, F. Nakaki, T. Yoshida, Y. Kato, S. Fagarasan, M. Muramatsu, T. Eto, K. Hioki, and T. Honjo. Pd-1 and lag-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice. *J Exp Med*, Feb 2011.
- [121] T. Oyama, S. Ran, T. Ishida, S. Nadaf, L. Kerr, D. P. Carbone, and D. I. Gabrilovich. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa b activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol*, 160(3):1224–32, Feb 1998.
- [122] L. Paco, A. M. Garcia-Lora, C. Casares, C. Cabrera, I. Algarra, A. Collado, I. Maleno, F. Garrido, and M. A. Lopez-Nevot. Total loss of hla class i expression on a melanoma cell line after growth in nude mice in absence of autologous antitumor immune response. *Int J Cancer*, 121(9):2023–30, Nov 2007.
- [123] D. Pardoll. T cells and tumours. *Nature*, 411(6841):1010–2, Jun 2001.
- [124] D. M. Pardoll. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2(4):227–38, Apr 2002.
- [125] R. V. Parry, J. M. Chemnitz, K. A. Frauwirth, A. R. Lanfranco, I. Braunstein, S. V. Kobayashi, P. S. Linsley, C. B. Thompson, and J. L. Riley. Ctla-4 and pd-1 receptors inhibit t-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*, 25(21):9543–53, Nov 2005.

- [126] Y. Peng, Y. Laouar, M. O. Li, E. A. Green, and R. A. Flavell. Tgf-beta regulates in vivo expansion of foxp3-expressing cd4+cd25+ regulatory t cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(13):4572–7, Mar 2004.
- [127] T. Pentcheva-Hoang, L. Chen, D. M. Pardoll, and J. P. Allison. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(45):17765–17770, 2007 Nov 6.
- [128] T. Pentcheva-Hoang, J. G. Egen, K. Wojnoonski, and J. P. Allison. B7-1 and b7-2 selectively recruit ctla-4 and cd28 to the immunological synapse. *Immunity*, 21(3):401–413, Sep 2004.
- [129] H. C. Probst, K. McCoy, T. Okazaki, T. Honjo, and M. van den Broek. Resting dendritic cells induce peripheral cd8+ t cell tolerance through pd-1 and ctla-4. *Nat Immunol*, 6(3):280–6, Mar 2005.
- [130] L. Prokunina, C. Castillejo-López, F. Oberg, I. Gunnarsson, L. Berg, V. Magnusson, A. J. Brookes, D. Tentler, H. Kristjansdóttir, G. Gröndal, A. I. Bolstad, E. Svenungsson, I. Lundberg, G. Sturfelt, A. Jönssen, L. Truedsson, G. Lima, J. Alcocer-Varela, R. Jonsson, U. B. Gyllensten, J. B. Harley, D. Alarcón-Segovia, K. Steinsson, and M. E. Alarcón-Riquelme. A regulatory polymorphism in pdcd1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet*, 32(4):666–9, Dec 2002.
- [131] V. Pulko, K. J. Harris, X. Liu, R. M. Gibbons, S. M. Harrington, C. J. Krco, E. D. Kwon, and H. Dong. B7-h1 expressed by activated cd8 t cells is essential for their survival. *J Immunol*, 187(11):5606–14, Dec 2011.
- [132] S. Radoja and A. B. Frey. Cancer-induced defective cytotoxic t lymphocyte effector function: another mechanism how antigenic tumors escape immune-mediated killing. *Mol Med*, 6(6):465–79, Jun 2000.
- [133] S. Radoja, M. Saio, D. Schaer, M. Koneru, S. Vukmanovic, and A. B. Frey. Cd8(+) tumor-infiltrating t cells are deficient in perforin-mediated cytolytic activity due to defective microtubule-organizing center mobilization and lytic granule exocytosis. *J Immunol*, 167(9):5042–5051, 2001 Nov 1.

- [134] G. Raimondi, W. J. Shufesky, D. Tokita, A. E. Morelli, and A. W. Thomson. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates cd4+cd25+ resting regulatory t cells from activated t cells. *J Immunol*, 176(5):2808–16, Mar 2006.
- [135] J. L. Riley. Pd-1 signaling in primary t cells. *Immunol Rev*, 229(1):114–25, May 2009.
- [136] E. Roussel, M. C. Gingras, E. A. Grimm, and J. A. Roth. High expression of adhesion molecules/activation markers with little interleukin-2, interferon gamma, and tumor necrosis factor beta gene activation in fresh tumor-infiltrating lymphocytes from lung adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 41(1):1–9, Jul 1995.
- [137] C. E. Rudd, A. Taylor, and H. Schneider. Cd28 and ctla-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev*, 229(1):12–26, May 2009.
- [138] T. Saito and T. Yokosuka. Immunological synapse and microclusters: the site for recognition and activation of t cells. *Curr Opin Immunol*, 18(3):305–13, Jun 2006.
- [139] T. Sasada, M. Kimura, Y. Yoshida, M. Kanai, and A. Takabayashi. Cd4+cd25+ regulatory t cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory t cells in disease progression. *Cancer*, 98(5):1089–99, Sep 2003.
- [140] Y. Sasahara, R. Rachid, M. J. Byrne, M. A. de la Fuente, R. T. Abraham, N. Ramesh, and R. S. Geha. Mechanism of recruitment of wasp to the immunological synapse and of its activation following tcr ligation. *Mol Cell*, 10(6):1269–81, Dec 2002.
- [141] H. Schneider, J. Downey, A. Smith, B. H. Zinselmeyer, C. Rush, J. M. Brewer, B. Wei, N. Hogg, P. Garside, and C. E. Rudd. Reversal of the tcr stop signal by ctla-4. *Science*, 313(5795):1972–5, Sep 2006.
- [142] B. Schreiner, M. Mitsdoerffer, B. C. Kieseier, L. Chen, H.-P. Hartung, M. Weller, and H. Wiendl. Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of b7-h1 (pd-l1), a strong inhibitor of autologous t-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 155(1-2):172–82, Oct 2004.
- [143] R. H. Schwartz. A cell culture model for t lymphocyte clonal anergy. *Science*, 248(4961):1349–56, Jun 1990.

- [144] W. C. Sha, C. A. Nelson, R. D. Newberry, D. M. Kranz, J. H. Russell, and D. Y. Loh. Selective expression of an antigen receptor on cd8-bearing t lymphocytes in transgenic mice. *Nature*, 335(6187):271–274, 1988 Sep 15.
- [145] A. H. Sharpe, E. J. Wherry, R. Ahmed, and G. J. Freeman. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*, 8(3):239–245, Mar 2007.
- [146] K.-A. Sheppard, L. J. Fitz, J. M. Lee, C. Benander, J. A. George, J. Wooters, Y. Qiu, J. M. Jussif, L. L. Carter, C. R. Wood, and D. Chaudhary. Pd-1 inhibits t-cell receptor induced phosphorylation of the zap70/cd3zeta signalosome and downstream signaling to pkctheta. *FEBS Lett*, 574(1-3):37–41, Sep 2004.
- [147] T. Shin, K. Yoshimura, T. Shin, E. B. Crafton, H. Tsuchiya, F. Housseau, H. Kosaki, R. D. Schulick, L. Chen, and D. M. Pardoll. In vivo costimulatory role of b7-dc in tuning t helper cell 1 and cytotoxic t lymphocyte responses. *J Exp Med*, 201(10):1531–41, May 2005.
- [148] Y. Shinkai, G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, and A. M. Stall. Rag-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate v(d)j rearrangement. *Cell*, 68(5):855–867, Mar 1992.
- [149] M. J. Smyth, D. I. Godfrey, and J. A. Trapani. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*, 2(4):293–9, Apr 2001.
- [150] E. M. Sotomayor, I. Borrello, E. Tubb, F. M. Rattis, H. Bien, Z. Lu, S. Fein, S. Schoenberger, and H. I. Levitsky. Conversion of tumor-specific cd4+ t-cell tolerance to t-cell priming through in vivo ligation of cd40. *Nat Med*, 5(7):780–7, Jul 1999.
- [151] M. T. Spiotto, P. Yu, D. A. Rowley, M. I. Nishimura, S. C. Meredith, T. F. Gajewski, Y. X. Fu, and H. Schreiber. Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity*, 17(6):737–747, 2002 Dec.
- [152] T. K. Starr, S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. Positive and negative selection of t cells. *Annu Rev Immunol*, 21:139–76, 2003.

- [153] K. Steinbrink, H. Jonuleit, G. Müller, G. Schuler, J. Knop, and A. H. Enk. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in cd8(+) t cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood*, 93(5):1634–42, Mar 1999.
- [154] Z.-W. Sun, Y.-H. Qiu, Y.-J. Shi, R. Tao, J. Chen, Y. Ge, Y.-m. Hu, H.-b. Ma, Q. Shi, and X.-g. Zhang. Time courses of b7 family molecules expressed on activated t-cells and their biological significance. *Cell Immunol*, 236(1-2):146–153, Jul-Aug 2005.
- [155] I. Tassi, J. Klesney-Tait, and M. Colonna. Dissecting natural killer cell activation pathways through analysis of genetic mutations in human and mouse. *Immunol Rev*, 214:92–105, Dec 2006.
- [156] J. M. Taube, R. A. Anders, G. D. Young, H. Xu, R. Sharma, T. L. McMiller, S. Chen, A. P. Klein, D. M. Pardoll, S. L. Topalian, and L. Chen. Colocalization of inflammatory response with b7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*, 4(127):127ra37, Mar 2012.
- [157] R. H. Thompson, M. D. Gillett, J. C. Cheville, C. M. Lohse, H. Dong, W. S. Webster, K. G. Krejci, J. R. Lobo, S. Sengupta, L. Chen, H. Zincke, M. L. Blute, S. E. Strome, B. C. Leibovich, and E. D. Kwon. Costimulatory b7-h1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(49):17174–9, Dec 2004.
- [158] R. H. Thompson, S. M. Kuntz, B. C. Leibovich, H. Dong, C. M. Lohse, W. S. Webster, S. Sengupta, I. Frank, A. S. Parker, H. Zincke, M. L. Blute, T. J. Sebo, J. C. Cheville, and E. D. Kwon. Tumor b7-h1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res*, 66(7):3381–5, Apr 2006.
- [159] A. M. Thornton and E. M. Shevach. Suppressor effector function of cd4+cd25+ immunoregulatory t cells is antigen nonspecific. *J Immunol*, 164(1):183–90, Jan 2000.
- [160] M. J. Turk, J. A. Guevara-Patiño, G. A. Rizzuto, M. E. Engelhorn, S. Sakaguchi, and A. N. Houghton. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory t cells. *J Exp Med*, 200(6):771–82, Sep 2004.

- [161] L. A. Turka, D. G. Schatz, M. A. Oettinger, J. J. Chun, C. Gorka, K. Lee, W. T. McCormack, and C. B. Thompson. Thymocyte expression of rag-1 and rag-2: termination by t cell receptor cross-linking. *Science*, 253(5021):778–81, Aug 1991.
- [162] E. Valk, C. E. Rudd, and H. Schneider. Ctla-4 trafficking and surface expression. *Trends Immunol*, 29(6):272–9, Jun 2008.
- [163] D. Valmori, V. Dutoit, D. Liénard, D. Rimoldi, M. J. Pittet, P. Champagne, K. Ellefsen, U. Sahin, D. Speiser, F. Lejeune, J. C. Cerottini, and P. Romero. Naturally occurring human lymphocyte antigen-a2 restricted cd8+ t-cell response to the cancer testis antigen ny-eso-1 in melanoma patients. *Cancer Res*, 60(16):4499–506, Aug 2000.
- [164] L. E. Van den Hove, S. W. Van Gool, H. Van Poppel, L. Baert, L. Coorevits, B. Van Damme, and J. L. Ceuppens. Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating t lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol*, 109(3):501–9, Sep 1997.
- [165] R. Varma, G. Campi, T. Yokosuka, T. Saito, and M. L. Dustin. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity*, 25(1):117–27, Jul 2006.
- [166] E. J. Vazquez-Cintron, N. R. Monu, and A. B. Frey. Tumor-induced disruption of proximal tcr-mediated signal transduction in tumor-infiltrating cd8+ lymphocytes inactivates antitumor effector phase. *J Immunol*, 185(12):7133–40, Dec 2010.
- [167] W. von Bernstorff, M. Voss, S. Freichel, A. Schmid, I. Vogel, C. Jöhnk, D. Henne-Bruns, B. Kremer, and H. Kalthoff. Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res*, 7(3 Suppl):925s–932s, Mar 2001.
- [168] J. Wang, T. Yoshida, F. Nakaki, H. Hiai, T. Okazaki, and T. Honjo. Establishment of nod-pdcd1-/- mice as an efficient animal model of type i diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(33):11823–8, Aug 2005.
- [169] E. J. Wherry and R. Ahmed. Memory cd8 t-cell differentiation during viral infection. *J Virol*, 78(11):5535–45, Jun 2004.
- [170] E. J. Wherry, S.-J. Ha, S. M. Kaech, W. N. Haining, S. Sarkar, V. Kalia, S. Subramaniam, J. N. Blattman, D. L. Barber, and R. Ahmed. Molecular signature of

- cd8+ t cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*, 27(4):670–684, Oct 2007.
- [171] E. Y. Woo, H. Yeh, C. S. Chu, K. Schlienger, R. G. Carroll, J. L. Riley, L. R. Kaiser, and C. H. June. Cutting edge: Regulatory t cells from lung cancer patients directly inhibit autologous t cell proliferation. *J Immunol*, 168(9):4272–6, May 2002.
 - [172] Y.-L. Wu, J. Liang, W. Zhang, Y. Tanaka, and H. Sugiyama. Immunotherapies: the blockade of inhibitory signals. *Int J Biol Sci*, 8(10):1420–30, 2012.
 - [173] T. Yamazaki, H. Akiba, H. Iwai, H. Matsuda, M. Aoki, Y. Tanno, T. Shin, H. Tsuchiya, D. M. Pardoll, K. Okumura, M. Azuma, and H. Yagita. Expression of programmed death 1 ligands by murine t cells and apc. *J Immunol*, 169(10):5538–45, Nov 2002.
 - [174] T. Yokosuka, M. Takamatsu, W. Kobayashi-Imanishi, A. Hashimoto-Tane, M. Azuma, and T. Saito. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit t cell receptor signaling by recruiting phosphatase shp2. *J Exp Med*, 209(6):1201–17, Jun 2012.
 - [175] P. Youngnak, Y. Kozono, H. Kozono, H. Iwai, N. Otsuki, H. Jin, K. Omura, H. Yagita, D. M. Pardoll, L. Chen, and M. Azuma. Differential binding properties of b7-h1 and b7-dc to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 307(3):672–7, Aug 2003.
 - [176] A. J. Zajac, J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, D. J. Sourdive, M. Suresh, J. D. Altman, and R. Ahmed. Viral immune evasion due to persistence of activated t cells without effector function. *J Exp Med*, 188(12):2205–13, Dec 1998.
 - [177] Y. Zhang, Y. Chung, C. Bishop, B. Daugherty, H. Chute, P. Holst, C. Kurahara, F. Lott, N. Sun, A. A. Welcher, and C. Dong. Regulation of t cell activation and tolerance by pdl2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(31):11695–700, Aug 2006.
 - [178] B. H. Zinselmeyer, S. Heydari, C. Sacristán, D. Nayak, M. Cammer, J. Herz, X. Cheng, S. J. Davis, M. L. Dustin, and D. B. McGavern. Pd-1 promotes immune exhaustion by inducing antiviral t cell motility paralysis. *J Exp Med*, 210(4):757–74, Apr 2013.

- [179] W. Zou. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*, 5(4):263–74, Apr 2005.

Tabelle 5.1.: Abkürzungsverzeichnis

APC (Fluorochrom)	Allophycocyanin
APC (Zelle)	Antigen Presenting Cell
BSA	Rinderserum-Albumin / Bovine Serum Albumin
BTLA	B- and T-Lymphocyte Attenuator
CD	Cluster of Differentiation
cSMAC	central Supramolecular Activation Cluster
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure / Deoxyribonucleic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Durchflusszytometrie / Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum / Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
ITSM	Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif
ko	knock-out
LAMP-1	Lysosomal-Associated Membrane Protein 1
MCH	Major Histocompatibility Complex
MTOC	Microtubule-Organizing Center
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung / Phosphate Buffered Saline
PD-1	Programmed Death Receptor 1
PD-L1 / 2	Programmed Death Receptor 1 Ligand 1 / 2
PE	Phycoerythrin
pSMAC	peripheral Supramolecular Activation Cluster
RAG	Recombinase Activation Gene
RT	Raumtemperatur / Room Temperature
TCR	T-Zell-Rezeptor / T Cell Receptor
tg	transgen
TGF	Transforming Growth Factor
TIL	Tumor-Infiltrierender Lymphozyt / Tumor-Infiltrating Lymphocyte
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

A. Danksagung

Meinem Mentor PD Dr. med. Christian Blank danke ich für für das Thema und die lang-jährige unermüdliche Betreuung dieser Doktorarbeit, für die Einführung in Forschung und Labor, für Diskussionen und Erklärungen, und ganz besonders für das großartige Forschungsjahr in Amsterdam am NKI samt eindrucksvollem Keystone-Meeting.

Bei Prof. Reinhard Andreesen und Prof. Andreas Mackensen bedanke ich mich für die erste Phase der Doktorarbeit in der Abteilung für Hämatologie/Onkologie in Regensburg und für den Austausch in der dortigen Arbeitsgruppe.

Ich danke meinen Kolleginnen der Arbeitsgruppe, Kerstin Schuster, Lisa Borkner und Christine Luginger, für geduldige Laborbetreuung, Rat und Tat und Ablenkung, sowohl in Regensburg als auch später in der niederländischen WG.

Besonders danke ich Jules Gadiot, der mich in der neuen AG Blank am NKI willkommen hieß, mir die niederländische Lebensweise beibrachte, und mir als guter Freund stets mit großer Hilfe, Humor und raffinierten Gadgets im Labor zur Seite stand.

Größter Dank gebührt meinen Eltern für die Ermöglichung eines unbeschwerten studentischen Lebens, für Besuche, mentale Unterstützung und regelmäßige Tritte und Fragen, wie es denn um die Doktorarbeit stehe - dieser Dank geht auch an mein wissenschaftliches Vorbild, meinen Bruder Moritz.

Zuletzt danke ich meiner lieben Lisa, die mir in der langen Zeit der Doktorarbeit, sowohl im Labor wie am Schreibtisch, den Rücken stärkte, Frust teilte und Erfolgsfreude verdoppelte, die den Schaffensprozess mit Verständnis wie auch konstruktiver Ungeduld begleitete, die mich nach Amsterdam ziehen ließ und mir die Rückkehr nach Regensburg so leicht machte. Ich danke Dir von ganzem Herzen!